

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
БІЛОЦЕРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

**Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису**

БІЛИЙ ВАДИМ ЮРІЙОВИЧ

УДК 606:637.336/.352(043.3)

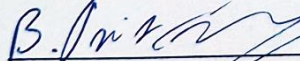
ДИСЕРТАЦІЯ

**УДОСКОНАЛЕННЯ БІОТЕХНОЛОГІЇ ВИГОТОВЛЕННЯ
СТАБІЛІЗОВАНОЇ ЗАКВАСКИ І ВИКОРИСТАННЯ ЇЇ
ЗА ВИРОБНИЦТВА М'ЯКИХ СИРІВ**

Спеціальність: 204 – Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва
Галузь знань: 20 – Аграрні науки та продовольство

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

 **Вадим БІЛИЙ**

Науковий керівник:

Сергій МЕРЗЛОВ,

доктор с.-г. наук, професор

Біла Церква – 2026

АНОТАЦІЯ

Білий В.Ю. Удосконалення біотехнології виготовлення стабілізованої закваски і використання її за виробництва м'яких сирів – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії із спеціальності 204 – Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва (20 – Аграрні науки та продовольство), Білоцерківський національний аграрний університет Міністерства освіти і науки України, Біла Церква, 2026.

У дисертаційній роботі викладені експериментальні дані удосконалення біотехнології екстракції із сичугів ензимів, їх іммобілізації, вивчення нешкідливості, гострої токсичності іммобілізованих сичужних ензимів на білих щурах і мишах, встановлення ефективності використання іммобілізованих сичужних ензимів за виробництва бринзи.

Дисертація виконана в умовах Інституту тваринництва та харчових технологій Білоцерківського національного аграрного університету, яка є розділом наукової тематики «Розроблення біотехнологій одержання стабільних ензимних та бактеріальних препаратів для виробництва кисломолочних продуктів» (№ держреєстрації 0119U005434).

Збільшення чисельності населення планети потребує зростання виробництва молока та продуктів його переробки. Така динаміка супроводжується збільшенням виробництва м'яких сирів, зокрема бринзи, які реалізуються на ринку України.

Важливим елементом технології бринзи є якісні сичужні ензими. Вони є тваринного, рослинного і мікробіологічного походження. Ензими мікробного та рослинного походження мають невисоку вартість. До недоліків таких ензимів слід віднести – низький вихід сирів, більш короткий термін їх зберігання і зниження якості вироблених продуктів. Застосування натуральних сичужних ензимів за технології бринзи має низку переваг. До недоліків таких ензимів

можна віднести проблему низького виходу ензимів із одиниці маси сичугів та час їх зберігання.

Для пролонгування зберігання та збільшення стійкості сичужних ензимів до денатуруючих факторів ефективним методом є їх іммобілізація на природних органічних носіях.

Науковий інтерес становлять дослідження щодо удосконалення екстракції сичужних ензимів із сичугів телят за використання оптимальних екстрагентів.

Невивченим залишається питання щодо використання харчових добавок як натуральних органічних носіїв для іммобілізації сичужних ензимів та встановлення ефективності їх застосування за технології бринзи.

Метою дисертаційної роботи є відпрацювання технологій одержання, стабілізації сичужних ензимів та встановлення ефективності їх використання за технології бринзи.

Для досягнення мети наукових досліджень вирішено завдання:

- встановлено оптимальний екстрагент для елімінації ензимів із подрібнених сичугів телят;
- розроблено спосіб стабілізації сичужних ензимів на органічних носіях;
- вивчено збереження активності нативних та іммобілізованих сичужних ензимів за різних умов і часу зберігання;
- досліджено нешкідливість іммобілізованих сичужних ензимів;
- встановлено гостру токсичність іммобілізованих сичужних ензимів;
- вивчено вплив використання стабілізованих сичужних ензимів на технологічні показники бринзи;
- досліджено мікробіологічні показники бринзи, біохімічні показники молока, бринзи та сироватки за використання стабілізованих сичужних ензимів;
- розраховано економічну ефективність використання стабілізованих сичужних ензимів за технології бринзи.

Дослідження проводили застосовуючи апробовані та сучасні методи дослідження: технологічні, біотехнологічні, хімічні, біохімічні, мікробіологічні, токсикологічні, спектрофотометричні, математично-статистичні.

Здобувач організував і виконав експерименти щодо встановлення оптимального екстрагента для екстракції сичужних ензимів із подрібнених сичугів, розробки способу іммобілізації сичужних ензимів на органічних носіях, вивчення нешкідливості та гострої токсичності іммобілізованих ензимів на лабораторних тваринах, встановлення ефективності використання іммобілізованих сичужних ензимів за технології бринзи.

Водночас провів аналіз та статистичний обрахунок цифрового матеріалу, отриманого під час експериментів. Підготовку загальної схеми досліджень, їх мету, інтерпретацію отриманих експериментальних даних та їх узагальнення виконано за допомоги наукового керівника, професора Сергія МЕРЗЛОВА.

Досліджуючи вплив віку телят на активність сичужних ензимів було встановлено, що за використання сичужних ензимів, екстрагованих із сичугів телят віком 2 тижні, вдалось найшвидше отримати сквашування молока. За внесення ензимів із сичугів телят 4- та 8-тижневого віку суттєвих відхилень щодо показника сквашування молока не спостерігали. Із підвищенням віку телят, від яких відбирали сичуги, початок згортання молока збільшувався.

Вивчаючи як екстрагент різні розчини соляної кислоти було встановлено, що у контролі (дистильована вода) вміст екстрагованих білків становив $28,0 \text{ мг/дм}^3$. Найвищий вміст екстрагованих білків ($38,4 \text{ мг/дм}^3$) зокрема сичужних ензимів, було отримано за співвідношення $0,2 \text{ г} : 10,0 \text{ см}^3 : 0,8 \text{ см}^3$ (гомогенат сичугів : об'єм дистильованої води : об'єм соляної кислоти).

Досліджуючи різні екстрагенти для екстракції сичужних ензимів (розчин соляної кислоти + молочна кислота; розчин соляної кислоти + лимонна кислота; розчин соляної кислоти + натрій хлорид) встановлено, що найефективнішим екстрагентом була суміш соляної і молочної кислот.

На показник екстракції ензимів із біоматеріалу впливає і величина подрібнення останнього. Враховуючи це, відпрацьовано підходи щодо величини подрібнення сичугів телят і встановлено показники екстракції із них ензимів. За використання подрібнених сичугів із величиною часток $0,03\text{--}0,6 \text{ мм}$ вміст загального білка у екстракті становив $89,8 \text{ мг/дм}^3$.

Доведено, що оптимальний розмір часток сичуга для екстракції становив 0,03–0,6 мм, оскільки показники екстракції загальних білків були найвищими порівняно з результатами даних інших груп. Збільшення розмірів часток сичугів призводить до зниження показника екстракції із них ензимів, що може пояснюватись зменшенням дії контакту екстрагента на біоматеріал.

Доведено, що на показники екстракції сичужних ензимів із біоматеріалу впливає час екстракції. Проводячи екстракцію лише 6,0 годин вдалось екстрагувати загального білка у кількості 63,3 мг/дм³. За підвищення часу екстракції від 14,0 до 22,0 годин вміст білка у екстракті був статистично більшим відносно групи де екстракцію проводили 12,0 годин.

Виявлені закономірності показників екстракції сичужних ензимів за оптимального гідромодуля. За співвідношення маси тканини (гомогенат сичугів) до об'єму екстрагента 1 : 49,72 та 1 : 44,20 кількість екстрагованих ензимів не знижується. Зниження кількості екстрагента, відповідно, на 30,0; 40,0; 50,0 та 60,0 % відносно показника у контролі не супроводжувалось статистично значущим зменшенням показника екстракції білків із гомогенату сичугів, зокрема ензимів. Найменшим співвідношенням, за якого не виявлено статистично значущого зниження показника екстракції ензимів із біоматеріалу було 1 : 16,57. Показник екстракції був меншим ніж у контролі на 0,13 %. Різниця не перевищувала показника похибки. Найменший показник екстракції ензимів із гомогенату сичугів було виявлено за співвідношення 1 : 2,76.

Стабілізацію сичужних ензимів проводили фізичним методом адсорбції за допомогою постійного перемішування розчинів ензимів із носіями за наявності спейсера (1,0 М CaCl₂), як носії застосовували суху сироватку та сухе молоко.

Встановлено, що використання іммобілізованих сичужних ензимів, які знаходились у 1,0 см³ екстракта продовж 60 хвилин, не привело до сквашування молока. Найшвидше формувався молочний згусток за сквашування стабілізованими ензимами, де об'єм екстракту становив 9,0 та 10,0

см³. У цих варіантах на 60 хвилину ферментації молочний згусток був щільним і відповідав чинним вимогам.

Порівнюючи ефективність використання сичужних ензимів, стабілізованих на сухій молочній сироватці та сухому молоці було встановлено, що за додавання ензимів, стабілізованих на сухій сироватці, утворення молочного згустку розпочалось на 6,0 хвилин раніше, ніж за варіанту з використанням ензимів стабілізованих на сухому молоці.

Досліджуючи період придатності сичужних ензимів, іммобілізованих на сухій сироватці було встановлено, що за внесення у молоко іммобілізованих сичужних ензимів на сухій сироватці, які зберігали 36 місяців за температури 2,0–4,0 °C формується щільний молочний згусток за 60 хвилин. Застосування нативних ензимів не дало можливості отримати сформованого згустку.

Використання сичужних ензимів, іммобілізованих на сухій сироватці молока, які зберігали 36 місяців за кімнатної температури, дозволяє отримати молочний згусток, але із незадовільною щільністю.

Доведено, що іммобілізовані сичужні ензими на сухому молоці за температури 2,0–4,0 та 17,0–21,0 °C зберігають свою активність, відповідно, впродовж 33 та 27 місяців. Порівнюючи іммобілізовані ензими на сухій сироватці та сухому молоці було доведено, що ензими, стабілізовані на сухій сироватці здатні довше зберігати свою активність на 3 місяці за кімнатної температури у порівнянні із ензимами, стабілізованими на сухому молоці.

Вивчаючи нешкідливість іммобілізованих сичужних ензимів встановлено, що у тварин за їх внутрішньошлункового введення не відмічали летальних випадків. Після першої доби і до кінця експерименту поведінка білих мишей як у контрольній так і дослідних групах відповідала фізіологічним нормам.

За проведення розтину тушок мишей та виконання патолого-анатомічних досліджень доведено, що стан внутрішніх органів тварин із дослідних груп не відрізнявся від стану внутрішніх органів мишей із контрольної групи. Показники білкового обміну та вміст сульфогідрильних груп у печінці мишей, яким вводили іммобілізовані сичужні ензими були в нормі.

Виявлено, що іммобілізовані на сухій сироватці сичужні ензими належать до малотоксичних речовин – 4 клас. DL_{50} іммобілізованих ензимів за внутрішньошлункового введення лабораторним тваринам (білі миші та щурі) є більшою 5000 мг/кг.

Дослідження свідчать, що за використання стабілізованих сичужних ензимів, одержаних за методикою суміші соляної та молочної кислот вихід готового продукту збільшується на 7,7 % відносно контролю, де використовували ензими мікробіального походження.

Проведено дослідження органолептичних показників одержаної бринзи за використання різних ензимів за 60-добового її зберігання. Встановлено, що бринза, виготовлена за використання іммобілізованих ензимів, яку зберігали 20 діб, мала чистий кисломолочний смак без сторонніх запахів. Консистенція була однорідна, ламка не крихка. Малюнок, колір сирного тіста та зовнішній вигляд теж відповідали чинним нормативним документам на цей сир. За розрізу головок сиру встановлено, що колір був гомогенним без сторонніх забарвлень і зональності.

Проводячи органолептичні дослідження зразків бринзи, виготовленої за використання стабілізованих сичужних ензимів, яку зберігали 40 діб, не було виявлено сторонніх присмаків. Консистенція продукту була однорідна. Частинки легко ламались без утворення дрібних крихт. Колір тіста залишався слабо-жовтим. На поверхні головок сформувалась незначна кірка. Застосування стабілізованих сичужних ензимів, одержаних за методикою з екстракцією сумішшю кислот за технології виготовлення бринзи пролонгує її зберігання, що підтверджується органолептичними показниками.

За використання іммобілізованих сичужних ензимів за технології бринзи встановлено ефективнішу трансформацію білків, а відповідно і амінокислот із молока у сирну масу у порівнянні із групами, де використовували ензимний препарат мікробного походження.

Доведно, що використання іммобілізованих сичужних ензимів за технології виробництва бринзи пролонгує зберігання готового продукту та

зберігає усі корисні молочнокислі мікроорганізми (*Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* та *Lactococcus lactis subsp cremoris*).

Доведено, що за використання іммобілізованих сичужних ензимів під час сквашування молока вихід бринзи збільшується на 6,2 %. Встановлено зниження собівартості готового продукту у дослідній групі на 5,4 % відносно показника у контролі.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше удосконалено спосіб екстракції сичужних ензимів за використання суміші неорганічної та органічної кислот. Доведено збільшення екстракції сичужних ензимів за оптимального співвідношення суміші соляної та молочної кислот. Встановлено оптимальний гідромодуль за екстракції ензимів із подрібнених сичугів.

Визначено оптимальні технологічні показники екстракції сичужних ензимів за використання суміші кислот (час екстракції, величина подрібнення сичугів).

Відпрацьовані елементи іммобілізації сичужних ензимів за використання органічних носіїв. Встановлено оптимальну матрицю для іммобілізації сичужних ензимів.

За проведення доклінічних досліджень на білих мишах та білих щурах доведено, що іммобілізовані сичужні ензими належать до нешкідливих, малотоксичних речовин.

Доведено ефективність використання іммобілізованих сичужних ензимів за технології бринзи.

Вивчено органолептичні показники, амінокислотний склад, бактеріальні показники, вихід бринзи, виготовленої за використання іммобілізованих сичужних ензимів.

Практичне значення результатів досліджень. Встановлено, що оптимальним екстрагентом для елімінації сичужних ензимів із сичугів за співвідношення 0,8 см³ : 0,2 см³ була суміш кислот соляної та молочної. Доведено, що за екстракції сумішшю кислот вихід сичужних ензимів збільшується відносно варіанту, де застосовували одну соляну кислоту.

Встановлено, що оптимальною величиною часток подрібнених сичугів і оптимальним часом екстракції є 0,03–0,6 мм та 20,0 годин.

Доведено, що оптимальним носієм для іммобілізації є суха сироватка молока корів. Іммобілізовані сичужні ензими на сухій сироватці мають стабільну активність за зберігання більше ніж 36 місяців.

Експериментально доведено, що іммобілізовані сичужні ензими належать до малотоксичних речовин – 4 клас. DL_{50} сичужних ензимів за внутрішньошлункового введення лінійним мишам і щурам є більшою 5000 мг/кг.

Експериментально виявлено, що за використання стабілізованих сичужних ензимів, одержаних за методикою із застосуванням суміші соляної та молочної кислот вихід бринзи збільшується на 7,7 % відносно контролю, де використовували ензими мікробіального походження.

На основі результатів модельних експериментів, технологічних і господарських досліджень підготовлено методичні рекомендації щодо біотехнології одержання, стабілізації і використання сичужних ензимів за технології бринзи. Рекомендації схвалено радою біолого-технологічного факультету Білоцерківського національного аграрного університету (БНАУ) (прот. № 7 від 06.05. 2025 р.).

Результати дисертаційної роботи можна застосовувати за викладання дисциплін: «Технологія переробки продукції тваринництва», «Технологія молока», «Аграрна біотехнологія», «Прикладна біотехнологія» у вищих навчальних закладах під час підготовки фахівців із спеціальностей: “Технологія виробництва та переробки продукції тваринництва”, «Харчові технології», “Біотехнології та біоінженерія”.

Ключові слова: бринза, лабораторні тварини, білі миші, білі щурі, нешкідливість іммобілізованих сичужних ензимів, гостра токсичність, амінокислотний склад, безпечність, якість, сироватка молока, суха сироватка молока, сухе молоко, іммобілізація ензимів, сичуги телят, молочнокислі бактерії.

ANNOTATION

Bilyi V. Improvement of the Biotechnology for Producing Stabilized Starter Culture and Its Use in the Production of Soft Cheeses – Qualification scientific work in manuscript form.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in specialty 204 – Technology of Production and Processing of Livestock Products (20 – Agricultural Sciences and Food), Bila Tserkva National Agrarian University of the Ministry of Education and Science of Ukraine, Bila Tserkva, 2026.

The dissertation presents experimental data on the improvement of the biotechnology for enzyme extraction from rennets, their immobilization, the study of the safety and acute toxicity of immobilized rennet enzymes in white rats and mice, and the determination of the effectiveness of using immobilized rennet enzymes in the production of bryndza cheese.

The dissertation was carried out at the Institute of Livestock and Food Technologies of Bila Tserkva National Agrarian University as part of the research project “Development of Biotechnologies for Obtaining Stable Enzyme and Bacterial Preparations for the Production of Fermented Milk Products” (State Registration №. 0119U005434).

The growing world population requires an increase in the production of milk and dairy products. This trend is accompanied by a rise in the production of soft cheeses, including bryndza, which is sold on the Ukrainian market.

An important element in the production technology of bryndza cheese is the use of high-quality rennet enzymes. These enzymes can be of animal, plant, or microbial origin. Enzymes of microbial and plant origin are relatively inexpensive. However, their disadvantages include low cheese yield, shorter shelf life, and reduced quality of the final products.

The use of natural rennet enzymes in bryndza production technology offers several advantages. However, these enzymes also have drawbacks, such as low extraction yield per unit mass of rennet and limited storage stability.

To prolong the shelf life and increase the resistance of rennet enzymes to denaturing factors, an effective method is their immobilization on natural organic carriers.

Scientific interest is focused on improving the extraction of rennet enzymes from calf rennets using optimal extractants. One underexplored issue remains the use of food additives as natural organic carriers for the immobilization of rennet enzymes and the assessment of their effectiveness in bryndza production technology.

The aim of the dissertation is to develop technologies for obtaining and stabilizing rennet enzymes and to determine their effectiveness in the production of bryndza cheese.

To achieve this goal, the following research tasks were addressed:

- determination of the optimal extractant for enzyme elimination from minced calf rennets;
- development of a method for stabilizing rennet enzymes on organic carriers;
- study of the activity retention of native and immobilized rennet enzymes under various storage conditions and durations;
- assessment of the safety of immobilized rennet enzymes;
- determination of the acute toxicity of immobilized rennet enzymes;
- study of the impact of stabilized rennet enzymes on the technological parameters of bryndza cheese;
- investigation of microbiological indicators of bryndza, as well as the biochemical parameters of milk, bryndza, and whey during the use of stabilized rennet enzymes;
- calculation of the economic efficiency of using stabilized rennet enzymes in bryndza production.

The research was conducted using approved and modern methods: technological, biotechnological, chemical, biochemical, microbiological, toxicological, spectrophotometric, and mathematical-statistical.

The applicant organized and carried out experiments to determine the optimal extractant for extracting rennet enzymes from minced rennets, developed a method

for immobilizing rennet enzymes on organic carriers, studied the safety and acute toxicity of immobilized enzymes on laboratory animals, and assessed the effectiveness of using immobilized rennet enzymes in bryndza production technology.

Statistical analysis and evaluation of the experimental data were performed. The overall research design, formulation of objectives, interpretation, and generalization of experimental results were completed under the supervision of Professor Serhii Merzlov.

In studying the effect of calf age on rennet enzyme activity, it was found that the fastest milk coagulation occurred when using enzymes extracted from rennets of 2-week-old calves. No significant differences in coagulation time were observed when using enzymes from calves aged 4 and 8 weeks. However, as the age of the calves increased, the milk coagulation time became longer.

When investigating different concentrations of hydrochloric acid as extractants, it was determined that the control sample (distilled water) yielded 28.0 mg/dm³ of extracted proteins. The highest protein content (38.4 mg/dm³), including rennet enzymes, was achieved with the ratio of 0.2 g : 10.0 cm³ : 0.8 cm³ (rennet homogenate : volume of distilled water : volume of hydrochloric acid).

In studying various extractants for the extraction of rennet enzymes (hydrochloric acid solution + lactic acid; hydrochloric acid solution + citric acid; hydrochloric acid solution + sodium chloride), it was found that the most effective extractant was the mixture of hydrochloric and lactic acids.

The efficiency of enzyme extraction from the biomaterial is also influenced by the degree of tissue grinding. Based on this, approaches were developed regarding the optimal particle size of calf rennet tissue, and the enzyme extraction indicators were determined. When using ground rennet with particle sizes of 0.03–0.6 mm, the total protein content in the extract reached 89.8 mg/dm³.

It was proven that the optimal particle size for enzyme extraction was 0.03–0.6 mm, as this range provided the highest total protein extraction results compared to other tested groups. An increase in rennet particle size led to a decrease in enzyme

extraction efficiency, likely due to reduced contact area between the extractant and the biomaterial.

It was also proven that the duration of extraction significantly affects rennet enzyme yield. After only 6 hours of extraction, the total protein content reached 63.3 mg/dm³. Increasing the extraction time from 14 to 22 hours resulted in a statistically significant increase in protein content compared to the 12-hour extraction group.

Regularities in rennet enzyme extraction under optimal hydromodule conditions were identified. At tissue-to-extractant volume ratios of 1 : 49.72 and 1 :44.20, the amount of extracted enzymes did not decrease. Reducing the amount of extractant by 30%, 40%, 50%, and 60% compared to the control did not result in a statistically significant decrease in protein (including enzyme) extraction from the rennet homogenate. The lowest ratio at which no statistically significant reduction in enzyme extraction was observed was 1 : 16.57, with the extraction yield only 0.13% lower than in the control group within the margin of error. The lowest extraction yield was recorded at a ratio of 1 : 2.76.

Stabilization of the rennet enzymes was performed using a physical adsorption method by continuously mixing enzyme solutions with carriers in the presence of a spacer (1.0 M CaCl₂). Dried whey and dried milk were used as carriers.

It was established that the use of immobilized rennet enzymes contained in 1.0 cm³ of extract over 60 minutes did not result in milk coagulation. The fastest formation of a milk curd was observed when stabilized enzymes were used in extract volumes of 9.0 and 10.0 cm³. In these cases, by the 60th minute of fermentation, a firm milk curd had formed, meeting the established quality standards.

When comparing the efficiency of rennet enzymes stabilized on dried whey and dried milk, it was found that the use of enzymes stabilized on dried whey led to the formation of milk curd 6 minutes earlier than when enzymes stabilized on dried milk were used.

The shelf life of rennet enzymes immobilized on dried whey was also studied. It was determined that immobilized rennet enzymes stored for 36 months at a temperature of 2.0–4.0 °C were still able to form a dense milk curd within 60

minutes. In contrast, native (non-immobilized) enzymes did not result in curd formation under the same conditions.

The use of rennet enzymes immobilized on dried whey and stored at room temperature for 36 months resulted in the formation of a milk curd, although its firmness was unsatisfactory.

It was proven that rennet enzymes immobilized on dried milk retain their activity for 33 months when stored at 2.0–4.0 °C and for 27 months at 17.0–21.0 °C. When comparing enzymes immobilized on dried whey versus dried milk, it was demonstrated that those stabilized on dried whey retained their activity 3 months longer under room temperature storage conditions than those stabilized on dried milk.

The safety of immobilized rennet enzymes was also investigated. No lethal outcomes were observed in animals after intragastric administration. From the first day and throughout the experiment, the behavior of white mice in both the control and experimental groups remained within physiological norms.

Post-mortem examinations and pathological-anatomical studies confirmed that the condition of internal organs in the experimental groups did not differ from that of the control group. Indicators of protein metabolism and the content of sulfhydryl groups in the liver of mice administered immobilized rennet enzymes were within normal ranges.

It was found that rennet enzymes immobilized on dried whey are classified as low-toxicity substances hazard class 4. The LD₅₀ of immobilized enzymes administered intragastrically to laboratory animals (white mice and rats) exceeded 5000 mg/kg.

The research shows that the use of stabilized rennet enzymes obtained using a method involving a mixture of hydrochloric and lactic acids resulted in a 7.7% increase in the yield of the final product compared to the control group, where microbial-origin enzymes were used.

Organoleptic properties of bryndza cheese produced using different enzymes were studied over a 60-day storage period. It was found that bryndza made with immobilized enzymes and stored for 20 days had a clean, fermented milk taste

without any off-flavors. The texture was uniform, brittle but not crumbly. The appearance, color of the cheese mass, and the internal structure met current regulatory standards for this type of cheese. Upon slicing the cheese heads, the color was found to be homogeneous, with no discoloration or zonalities.

Organoleptic analysis of bryndza samples made with stabilized rennet enzymes and stored for 40 days revealed no foreign tastes. The texture remained uniform, with particles breaking cleanly without producing fine crumbs. The paste maintained a light yellow color. A slight rind formed on the surface of the cheese heads. The use of stabilized rennet enzymes obtained via an extraction method based on an acid mixture extended the shelf life of bryndza, as confirmed by organoleptic indicators.

When using immobilized rennet enzymes in bryndza production, more efficient transformation of milk proteins and consequently, amino acids into cheese mass was observed compared to the groups where microbial enzyme preparations were used.

It was proven that the use of immobilized rennet enzymes in the production of bryndza prolongs the shelf life of the final product while preserving all beneficial lactic acid microorganisms (*Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* and *Lactococcus lactis subsp cremoris*).

It was also demonstrated that using immobilized rennet enzymes during milk coagulation increased the bryndza yield by 6.2%. Furthermore, a 5.4% reduction in production cost was recorded in the experimental group compared to the control.

Scientific Novelty of the Obtained Results. For the first time, a method for extracting rennet enzymes using a mixture of inorganic and organic acids was improved. It was proven that the extraction efficiency of rennet enzymes increases when using an optimal ratio of hydrochloric and lactic acids. The optimal hydromodule for enzyme extraction from minced rennets was established.

Optimal technological parameters for enzyme extraction using the acid mixture were determined, including extraction time and rennet particle size.

The immobilization process of rennet enzymes using organic carriers was refined. The optimal matrix for immobilizing rennet enzymes was identified.

Based on preclinical studies conducted on white mice and rats, it was proven that immobilized rennet enzymes are non-toxic and belong to the low-toxicity class of substances.

The effectiveness of immobilized rennet enzymes in bryndza production technology was confirmed.

Organoleptic properties, amino acid composition, bacterial indicators, and yield of bryndza produced with immobilized rennet enzymes were comprehensively studied.

Practical Significance of the Research Results. It was established that the optimal extractant for rennet enzyme elimination from rennet tissue is a mixture of hydrochloric and lactic acids (in a ratio of 0.8 cm³ : 0.2 cm³, respectively). It was proven that enzyme yield increases when using the acid mixture compared to using hydrochloric acid alone.

The optimal rennet tissue particle size and extraction duration were determined to be 0.03–0.6 mm and 20.0 hours, respectively.

It was proven that the most effective carrier for enzyme immobilization is dried cow's milk whey. Rennet enzymes immobilized on dried whey retain stable activity during storage for over 36 months.

Experimental data confirmed that immobilized rennet enzymes are classified as low-toxicity substances (hazard class 4). The LD₅₀ of rennet enzymes administered intragastrically to laboratory mice and rats exceeds 5000 mg/kg.

Experimental results demonstrated that the use of stabilized rennet enzymes obtained using a method involving a mixture of hydrochloric and lactic acids increased bryndza cheese yield by 7.7% compared to the control group, where microbial-origin enzymes were used.

Based on the outcomes of model experiments, as well as technological and production studies, methodological recommendations were developed concerning the biotechnology of obtaining, stabilizing, and using rennet enzymes in bryndza cheese production. These recommendations were approved by the Council of the Faculty of

Biological and Technological Sciences of Bila Tserkva National Agrarian University (BNAU) (Protocol №. 7, dated May 6, 2025).

The results of this dissertation can be applied in teaching the following academic disciplines: "Technology of Animal Products Processing", "Milk Technology", "Agricultural Biotechnology", and "Applied Biotechnology" at higher education institutions when training specialists in the fields of "Technology of Production and Processing of Livestock Products", "Food Technologies", and "Biotechnology and Bioengineering".

Key words: bryndza, laboratory animals, white mice, white rats, safety of immobilized rennet enzymes, acute toxicity, amino acid composition, milk whey, dried whey, dried milk, enzyme immobilization, calf rennets, lactic acid bacteria.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті в наукових фахових виданнях України, включених до міжнародних наукометричних баз даних Scopus та/або Web of Science Core Collection:

1. Мерзлов С. В., Білий В. Ю., Риндін А. В. Дія екстрагентів на показники елімінації сичужних ензимів. *Наукові горизонти*. 2019. №. 8 (81). С. 77–81. DOI: 10.33249/2663-2144-2019-81-8-77-81 (0,1 д.а.; здобувачем проведено дослідження, здійснено обробку результатів та їх аналіз, підготовку статті до друку).

2. Bilyi V., Merzlov S., Narizhnyy S., Mashkin Y., Merzlova G. Amino Acid Composition of Whey and Cottage Cheese Under Various Rennet Enzymes. *Scientific Horizons*. 2021. Vol. 24. № 9. P. 19–25. DOI: 10.48077/scihor.24(9).2021.19-25 (0,15 д.а.; здобувачем проведено дослідження, здійснено обробку результатів та їх аналіз, підготовку статті до друку).

Статті в наукових фахових виданнях України:

1. Білий В. Ю., Мерзлов С. В. Вплив різних сичужних екзимів на технологічні та сенсорні показники бринзи. *Вісник Полтавської державної*

аграрної академії. 2022. № 1. С. 103–109. DOI: 10.31210/visnyk2022.01.13 (0,25 д.а.; здобувачем проведено дослідження, здійснено обробку результатів та їх аналіз, підготовку статті до друку).

2. **Bilyi V. Y.**, Merzlov S. V. Effect of some current enzymes on milk coagulation indicators. *Scientific Messenger LNUVMB*. Series: Agricultural sciences. 2022. Vol. 24. № 96. P. 144–147. DOI: 10.32718/nvlvet-a9620. (0,1 д.а.; здобувачем проведено дослідження, здійснено обробку результатів та їх аналіз, підготовку статті до друку).

3. Kholodenko I. V., Bila V. V., **Bilyi V. Yu.**, Mashkin, Y. O. Sensory indicators of suluguni cheese when using enzyme preparations of different origins in the technology of soft cheeses. *Scientific Messenger LNUVMB*. Series: Food Technologies. 2023. Vol. 25. № 99. P. 104–107. DOI: 10.32718/nvlvet-f9918 (0,1 д.а.; здобувачем проведено дослідження, здійснено обробку результатів та їх аналіз, підготовку статті до друку).

4. Наріжний С. А., **Білий В. Ю.**, Рудакова Т. В., Мінорова А. В., Вежлівцева С. П. Формування структури низькокалорійного морозива із рослинними складовими. *Збірник наукових праць «Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва»*. 2023. № 1. С. 124–131. DOI: 10.33245/2310-9289-2023-178-1-124-131 (0,06 д.а.; здобувачем проведено дослідження, здійснено обробку результатів та їх аналіз, підготовку статті до друку).

5. Bila V. V., Merzlova H. V., **Bilyi V. Y.**, Merzlov S. V., Mashkin Y. O. Microbiological indicators of cottage cheese using different rennet leavens. *Scientific Messenger LNUVMB*. Series: Food Technologies. 2024. Vol. 26. № 101. P. 3–7. DOI: 10.32718/nvlvet-f10101 (0,08 д.а.; здобувачем проведено дослідження, здійснено обробку результатів та їх аналіз, підготовку статті до друку).

Матеріали науково-практичних конференцій:

1. **Білий В. Ю.**, Мерзлов С. В. Біотехнологічні методи екстракції хімозину та ефективність їх використання. Аграрна освіта та наука: досягнення,

роль, фактори росту. Сучасний розвиток технологій тваринництва. Інноваційні підходи в харчових технологіях: матеріали міжнародної науково-практичної конференції. (Білоцерківський НАУ, 21 жовтня 2021 р.). Біла Церква, 2021. С. 51–52. *(підготовлено й оформлено матеріали публікації та презентації, особисто здійснено усну доповідь на конференції).*

2. **Білий В.Ю.**, Мерзлов С.В. Дія різних сичужних ензимів на показники коагуляції молока. Аграрна освіта та наука: досягнення, роль, фактори росту: Сучасний розвиток технологій тваринництва. Інноваційні підходи в харчових технологіях: матеріали міжнародної науково-практичної конференції (Білоцерківський НАУ, 20 жовтня 2022 р.). Біла Церква, 2022. С. 51–53. *(підготовлено й оформлено матеріали публікації та презентації, особисто здійснено усну доповідь на конференції).*

3. Bila V.V., **Bilyi V.Yu.**, Merzlova H.V., Merzlov S.V. Indicators of suluguni cheese when using enzyme preparations of different origin. Сучасний розвиток технологій тваринництва. Інноваційні підходи у харчових технологіях: матеріали міжнародної науково-практичної конференції. (Білоцерківський НАУ 26 жовтня 2023 р.). Біла Церква, 2023. С. 74–75. *(підготовлено й оформлено матеріали публікації та презентації).*

Патент України на корисну модель:

1. **Білий В.Ю.**, Мерзлов С.В., Мерзлова Г.В., Біла В.В., Машкін Ю.О. Спосіб екстракції сичужних ензимів: пат. № 156438; № заявки u 202107113; заявл. 10.12.2021; опубл. 26.06.2024, № 26/2024 *(здобувачем проведено патентний пошук та дослідження, здійснено обробку результатів та їх аналіз, підготовлено матеріал до подання).*

ЗМІСТ

	АНОТАЦІЯ.....	2
	ВСТУП.....	21
	РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	27
1.1.	Сировина та технологія бринзи.....	27
1.2.	Одержання сичужних ензимів і їх використання в молочній промисловості.....	37
1.3.	Способи стабілізації ензимів.....	43
1.4.	Висновок з огляду літератури.....	48
	РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕНЬ.....	49
2.1.	Матеріали, місце проведення досліджень та умови проведення дослідів.....	50
2.2.	Методи дослідження показників.....	52
	РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	62
3.1.	Відпрацювання технології екстракції сичужних ензимів.....	62
3.1.1.	Встановлення впливу віку телят на активність їх сичужних ензимів.....	62
3.1.2.	Встановлення оптимального екстрагента.....	64
3.1.3.	Відпрацювання оптимальних режимів екстракції ензимів (подрібнення, час екстракції).....	68
3.1.4.	Встановлення оптимального гідромодуля.....	70
3.1.5.	Дослідження активності іммобілізованих сичужних ензимів.....	72
3.2.	Встановлення нешкідливості та гострої токсичності стабілізованих сичужних ензимів.....	83
3.3.	Дослідження технології бринзи за використання іммобілізованих ензимів.....	90
3.3.1.	Вплив іммобілізованих сичужних ензимів на вихід бринзи та її органолептичні показники.....	90
3.3.2.	Амінокислотний склад сироватки, молока та бринзи за використання різних ензимів.....	96

3.3.3.	Дослідження мікробіологічного складу бринзи залежно від використання різної форми ензимів.....	101
3.3.4.	Реологічні дослідження бринзи.....	109
3.4.	Економічна доцільність іммобілізації сичужних ензимів та їх використання за технології бринзи.....	111
	РОЗДІЛ 4. УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ....	114
	ВИСНОВКИ.....	126
	ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ.....	128
	СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	129
	ДОДАТКИ.....	155

ВСТУП

Актуальність проблеми. Повноцінне харчування має важливе значення у підтримці здоров'я та працездатності людей. Вагоме місце в раціонах населення як нашої країни так і зарубіжжя займають сири, отримані за допомогою концентрації та біотрансформації основних складових молока під впливом ензимів, мікроорганізмів і фізико-хімічних чинників [25, 39, 42, 152, 153].

До традиційних сирів в Україні можна віднести бринзу. Для виробництва бринзи застосовують переважно молоко корів і закваску. Невід'ємною частиною закваски для технології сиру є сичужні ензими. Вони є тваринного, рослинного і мікробіологічного походження. Мікробні і рослинні ензими, які здатні проводити згортання молока, мають невисоку собівартість. До недоліків таких ензимів слід віднести – низький вихід сирів, більш короткий термін їх зберігання і зниження якості вироблених продуктів. Застосування натуральних сичужних ензимів за технології бринзи має низку переваг. Проте є проблема виходу ензимів із одиниці маси сичугів та час їх зберігання [41, 49].

Ефективним способом збільшення стійкості сичужних ензимів до денатуруючих факторів і пролонгування часу їх зберігання є їх іммобілізація на природних органічних носіях, які належать до харчових добавок.

Науковий інтерес становлять дослідження щодо удосконалення екстракції сичужних ензимів із сичугів телят за використання оптимальних екстрагентів.

Невивченим залишається питання щодо використання харчових добавок як натуральних органічних носіїв для іммобілізації сичужних ензимів та встановлення ефективності їх застосування за технології бринзи.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота є фрагментом тематики, що виконується в Інституті тваринництва та харчових технологій Білоцерківського національного аграрного університету: «Розроблення біотехнологій одержання стабільних ензимних та бактеріальних препаратів для виробництва кисломолочних

продуктів» (№ держреєстрації 0119U005434), яка виконується впродовж 2019–2025 рр.

Мета і завдання дослідження. Метою є відпрацювання технологій одержання, стабілізації сичужних ензимів та встановлення ефективності їх використання за технології бринзи.

Для реалізації мети дисертаційної роботи були сформовані завдання:

- встановити оптимальний екстрагент для елімінації ензимів із подрібнених сичугів телят;
- розробити спосіб стабілізації сичужних ензимів на органічних носіях;
- вивчити збереження активності нативних та іммобілізованих сичужних ензимів за різних умов і часу зберігання;
- дослідити нешкідливість іммобілізованих сичужних ензимів;
- встановити гостру токсичність іммобілізованих сичужних ензимів;
- вивчити вплив використання стабілізованих сичужних ензимів на технологічні показники бринзи;
- дослідити мікробіологічні показники бринзи, біохімічні показники молока, бринзи та сироватки за використання стабілізованих сичужних ензимів;
- розрахувати економічну ефективність використання стабілізованих сичужних ензимів за технології бринзи.

Об'єкт дослідження – розробка технології одержання стабілізованих сичужних ензимів та встановлення ефективності використання їх за технології бринзи.

Предмет дослідження – екстрагенти, технологія екстракції сичужних ензимів із сичугів, сичуги телят різного віку, білі миші, білі шурі, молоко корів (сировина), молочна кислота, кухонна сіль.

Методи дослідження:

- біотехнологічні – екстракція сичужних ензимів за використання різних екстрагентів, їх стабілізація із використанням органічних носіїв;
- мікробіологічні – підрахунок молочнокислих бактерій і виявлення патогенної мікрофлори у сирах;

- токсикологічні – визначення нешкідливості і гострої токсичності стабілізованих сичужних ензимів;
- біохімічні – дослідження вмісту загального білка, сульфогідрильних груп, активності аспартатамінотрансферази (АсАт), аланінамінотрансферази (АлАт) у печінці лабораторних тварин, глюкози і гемоглобіну у крові мишей;
- хімічні – встановлення титрованої кислотності сироватки молока;
- спектрофотометричні – дослідження вмісту заміennих і незамінних амінокислот у молоці, сирах;
- технологічні – встановлення часу зберігання стабілізованих сичужних ензимів, величини подрібнення сичугів на показники екстракції сичужних ензимів;
- математично-статистичні – визначення економічної ефективності використання стабілізованих сичужних ензимів за технології бринзи; обрахунок середнього арифметичного, похибки до нього.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше удосконалено спосіб екстракції сичужних ензимів за використання суміші неорганічної та органічної кислот. Доведено збільшення екстракції сичужних ензимів за оптимального співвідношення суміші соляної та молочної кислот. Встановлено оптимальний гідромодуль за екстракції ензимів із подрібнених сичугів.

Визначено оптимальні технологічні показники екстракції сичужних ензимів за використання суміші кислот (час екстракції, величина подрібнення сичугів).

Відпрацьовані елементи іммобілізації сичужних ензимів за використання органічних носіїв. Встановлено оптимальну матрицю для іммобілізації сичужних ензимів.

За проведення доклінічних досліджень на білих мишах та білих щурах доведено, що іммобілізовані сичужні ензими належать до нешкідливих, малотоксичних речовин.

Доведено ефективність використання іммобілізованих сичужних ензимів за технології бринзи.

Вивчено органолептичні показники, амінокислотний склад, бактеріальні показники, вихід бринзи виготовленої за використання іммобілізованих сичужних ензимів.

Практичне значення результатів досліджень. Встановлено, що оптимальним екстрагентом для елімінації сичужних ензимів із сичугів за співвідношення $0,8 \text{ см}^3 : 0,2 \text{ см}^3$ була суміш кислот соляної та молочної. Доведено, що за екстракції сумішшю кислот вихід сичужних ензимів збільшується у 2,3 рази відносно варіанту де застосовували одну соляну кислоту.

Встановлено, що оптимальною величиною часток подрібнених сичугів і оптимальним часом екстракції є $0,03\text{--}0,6 \text{ мм}$ та $20,0 \text{ годин}$.

Доведено, що оптимальним носієм для іммобілізації є суха сироватка молока корів. Іммобілізовані сичужні ензими на сухій сироватці мають стабільну активність за зберігання більше ніж 36 місяців.

Експериментально доведено, що іммобілізовані сичужні ензими належать до малотоксичних речовин – 4 клас. DL_{50} сичужних ензимів за внутрішньошлункового введення лінійним мишам і щурам є більшою 5000 мг/кг .

Експериментально виявлено, що за використання стабілізованих сичужних ензимів одержаних за методикою із застосуванням суміші соляної та молочної кислот вихід бринзи збільшується на $7,7 \%$ відносно контролю, де використовували ензими мікробіального походження.

На основі результатів модельних експериментів, технологічних і господарських досліджень підготовлено методичні рекомендації щодо біотехнології одержання, стабілізації і використання сичужних ензимів за технології бринзи. Рекомендації схвалені радою біолого-технологічного факультету Білоцерківського національного аграрного університету (БНАУ) (прот. № 7 від 06.05. 2025 р.).

Експериментальні дані одержані під час виконання дисертаційної роботи можна використовувати за читання курсу лекцій: «Загальна біотехнологія»,

«Харчова біотехнологія», «Технологія переробки продукції тваринництва», у вищих навчальних закладах під час підготовки фахівців за освітніми програмами: «Технологія виробництва та переробки продукції тваринництва», «Харчові технології», «Біотехнологія та біоінженерія».

Особистий внесок здобувача. Дисертант самостійно провів патентний пошук, підбір як вітчизняних так і зарубіжних першоджерел за темою дисертації, здійснив їх аналіз, організував і провів модельні та виробничі дослідження щодо екстракції сичужних ензимів, їх стабілізації, вивчення нешкідливості та ефективності використання в технології бринзи.

Провів виробничу перевірку, здійснив статистичні розрахунки цифрового матеріалу експериментальних даних, провів їх апробацію, доповідаючи на конференціях, публікуючи тези та статті у фахових виданнях.

Дослідження вмісту амінокислот у молоці, сироватці та сирах здійснювали за підтримки фахівців Науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок, за надану допомогу автор висловлює сердечну подяку.

Складання загальної схеми експериментів, інтерпретацію одержаних цифрових даних, формування загальних висновків проводив за допомоги наукового керівника дисертаційної роботи доктора сільськогосподарських наук, професора Сергія МЕРЗЛОВА.

Апробація результатів досліджень. Результати експериментів оприлюднювались на засіданнях академічної ради та вченої ради біолого-технологічного факультету Білоцерківського національного аграрного університету (2017–2024 рр.), Міжнародній науково-практичній конференції «Новітні технології виробництва та переробки продукції тваринництва» (Біла Церква, 2017), Міжнародній науково-практичній конференції «Аграрна освіта та наука: досягнення, роль, фактори росту» (Біла Церква, 2018), Міжнародній науково-практичній конференції «Інноваційні технології виробництва та переробки продукції тваринництва» (Біла Церква, 2019), Міжнародній науково-практичній конференції «Проблеми виробництва екологічно чистої продукції

тваринництва. Присвячена 85-річчю створення кафедри технології кормів, кормових добавок та годівлі тварин Білоцерківського НАУ» (Біла Церква, 2020), Міжнародній науково-практичній конференції «Сучасний розвиток технологій тваринництва. Інноваційні підходи в харчових технологіях» (Біла Церква, 2021).

Публікації. Одержані результати досліджень за темою дисертаційної роботи було опубліковано у 11 наукових працях: 5 статей у наукових фахових виданнях України, 2 статті у виданнях, що включені у міжнародну наукометричну базу даних Scopus, 3 тези доповідей на міжнародних науково-практичних конференціях та один патент.

Структура та обсяг дисертаційної роботи. До змісту кваліфікаційної роботи увійшли розділи: анотація; вступ; огляд літератури (розділ I); матеріали і методи дослідження (розділ II); результати власних досліджень (розділ III); аналіз та узагальнення результатів досліджень (розділ IV); висновки, пропозиції; список використаних джерел і додатки. Робота викладена на 158 сторінках комп'ютерного тексту, містить 10 рисунків і 44 таблиці. Список літератури включає 261 джерело, зокрема 215 – латиницею.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Сировина та технологія бринзи

У раціонах харчування людей важливе місце займають сири, які є продуктом складної біотехнологічної переробки молока, в результаті якої відбувається концентрація його основних компонентів з подальшою їх ферментацією [38, 63, 77].

Фізіологічна норма споживання сиру для дорослої людини в середньому становить 6,6 кг на рік, а його фактичне споживання у світі – 2,5 кг [201]. Щодо статистики в Україні то на одну людину впродовж року в середньому припадає 1,5 кг сиру, що недостатньо, порівняно з такими країнами Європи як Греція, Франція, Німеччина, Нідерланди та Італія де споживання продукту становить 20 кг/рік на людину [53, 63, 76, 103].

Сири – це харчові продукти, отримані за допомогою концентрації та біотрансформації основних компонентів молока під впливом ензимів, мікроорганізмів і фізико-хімічних факторів [103, 135]. Їх можна розглядати як біокомплексну екосистему, колонізовану групою різноманітних мікроорганізмів, які є основними учасниками сприйманих сенсорних атрибутів різних типів сиру, в результаті їх складної взаємодії з молочними білками, вуглеводами та жирами, що відбувається у важливому технологічному процесі за виробництва сирів, відомому як «дозрівання» [131, 141, 220, 229].

Крім того, сири містять комплекс жиру, масова частка якого коливається від 5–10 % до 60 % в сухій речовині, і водорозчинні вітаміни, а також багато мікроелементів [149, 233, 241].

Смак сиру значною мірою залежить від вмісту жиру і його стану. Сир є динамічною системою яка докорінно змінюється під час дозрівання. Асортимент сиру нараховує кілька сотень найменувань, що дозволяє повною мірою задовольняти запити споживачів [114].

На сьогодні загальноприйнятої класифікації сирів немає, є декілька основних. За технологічною класифікацією в основі лежать такі ознаки:

параметри виробництва (температура другого нагрівання, рівень активної кислотності сирної маси, оптимальний вміст води в сирі після пресування, концентрація кухонної солі в сирі, умови визрівання), вид бактеріальних культур, особливості перебігу та спрямованість мікробіологічних і біохімічних процесів за визрівання та важливо органолептичні властивості сирів [40, 188].

Також за технологією сири ділять на такі групи: сири натуральні та перероблені [79]. Натуральні: сири сичужні тверді з високою температурою другого нагрівання (швейцарський та ін.), сири сичужні тверді з низькою температурою другого нагрівання (голландський), сири сичужні тверді з низькою температурою другого нагрівання та високим рівнем молочнокислого бродіння (чеддер) [122], сири сичужні напівтверді, що визрівають за участю мікрофлори сирного слизу (латвійський), м'які сири (сичужні, сичужно-кислотні, кислотні, зрілі і свіжі), сири розсільні, сири сичужні та сирна маса для виробництва плавлених сирів [52, 134, 174].

До перероблених сирів належать плавлені сири, сири в керамічних горщиках, бурдючні, сухі. Найбільше поширення одержали плавлені сири [201].

Залежно від виду основної сировини, технології та хімічного складу плавлені сири діляться на шість груп: кускові, ковбасні, пастоподібні, солодкі, солоні та консервовані [34].

Вчений З.Х. Диланян ввів у класифікацію сирів, крім маси, води і солі, також якісний склад мікрофлори, під впливом якої формується той чи інший вид сиру [15]. Ця класифікація сирів має такий вигляд:

- 1 клас – сичужні сири [35], який поділяється на 1-й підклас (тверді сири):
 - з високотемпературною обробкою сирної маси, що пресуються;
 - самопресовані з чеддеризацією і плавленням сирної маси;
 - з низькотемпературною обробкою сирної маси; пресовані;
 - самопресовані з повною або частковою чеддеризацією сирної маси до формування;
 - самопресовані з копченням сирної маси; безкіркові;

- самопресовані, що визрівають у розсільному середовищі;
- із чеддеризацією сирної маси до формування;
- самопресовані сири, що споживаються у свіжому вигляді;

2-й підклас (напівтверді) – самопресовані сири;

3-й підклас (м'які сири): які визрівають під впливом молочнокислих та луготвірних бактерій сирного слизу; що визрівають під впливом молочнокислих, луготвірних бактерій сирного слизу і мікроскопічних грибів; які визрівають під впливом молочнокислих бактерій і мікроскопічних грибів (плісені) [46, 51].

II клас – кисломолочні сири: 1-й підклас (свіжі сири); 2-й підклас (витримані сири); 3-й підклас (перероблені сири) плавлені, бурдючні, горшкові, у полімерній плівці.

До розсільних сирів належать: чанах, тушинський кобійський, осетинський, єреванський, сулугуні, лиманський, чечиль, бринза та ін. [118, 194]. Їх можна виробляти з коров'ячого або овечого молока. Основна ознака розсільних сирів це їх визрівання в розсолі [14,16]. В Україні популярним представником розсільних сирів є Бринза, Фета і Моцарелла [57, 166]. Сир бринзу можна використовувати для кулінарних цілей, промислової переробки та безпосередньо вживати в їжу [14, 16].

Бринза – висококонцентрована полідисперсна система, особливості якої обумовлені розмірами часток дисперсної фази [227]. Речовини дисперсної фази (білки, молочний жир) знаходяться в дисперсному середовищі (іонно-молекулярний розчин лактози, азотні речовини, мінеральні солі, органічні кислоти та інші сполуки) [13, 173].

Вона зазвичай має білий (близький до білого) колір, однорідний за всією масою. Смак і запах бринзи кисломолочні, в міру солоні. Консистенція – помірно щільна, частіше тверда, злегка ламка, без схильності до кришення. Малюнок на зрізі відсутній, допускається наявність невеликої кількості вічок і порожнеч неправильної форми [39, 97, 152, 153, 197]. Масова частка жиру в сухій речовині бринзи має бути не менш як 50 %; вологи перед солінням – 51–

61 %, вологи в зрілому сирі – 53 %; хлориду натрію – 3–5 %; оптимальне значення рН сиру перед солінням становить 5,3–5,4, зрілого сиру – 5,20–5,35; тривалість дозрівання бринзи становить 20 діб [27, 29, 185].

Бринза кірки не має, поверхня чиста, рівна, зі слідами серп'янки (сітки з льону або синтетики для відділення сироватки і розсолу), допускається невелика деформація брусків і незначні тріщини [36, 199]. Її, здебільшого, виробляють із незбираного пастеризованого коров'ячого молока. Виготовлення бринзи з непастеризованого молока допускається як виняток на відгінних пасовищах на невеликих заводах за обов'язкової витримки (дозрівання) її не менш ніж 60 діб на підприємствах [10].

У середньому жирність бринзи становить 40 %. Однак найсмачнішим вважається сир з масовою часткою жиру 50 % [14, 16]. Зберігають бринзу не більше 7 діб. За зберігання її у розсолі термін зберігання продовжується до 2 тижнів [227].

Першими готувати бринзу навчилися народи-кочівники, які займалися скотарством. Вчені вважають, що бринза з'явилася більше 7 тисяч років тому в одній з країн Арабського Сходу [14, 16]. Вчені знайшли рештки продуктів такі як хліб та сир ранньої колиски цивілізації, що розташовано між річками Єфрат і Тигр в Іраку (6000–7000 років до н.е.). Після археологічного обстеження області навколо Ура, сер Леонард Вуллі в 1924 році зробив висновок, що сир було зроблено там з молока як корів, так і кіз. Від цієї області ці шляхи поширюються на схід до Індії і Тибету, північний захід через Каспійські та Чорні моря до річок Дніпра і Дунаю, звідти до центральної й північної Європи та Заходу через Середземномор'я, Егейські та Адріатичні моря до Південної і Центральної Європи [14,16].

Виробництво сирів передбачає такі етапи: коагуляцію молока, відокремлення сирної маси від сироватки, формування, пресування під зовнішнім тиском або особистої ваги, соління, а споживання в їжу – зразу після виготовлення або дозрівання [82, 188].

Молоко, яке використовують для виробництва сирів, має відповідати встановленим вимогам, тобто бути сиропридатним, що характеризується комплексом показників: фізико-хімічних, біохімічних, технологічних та гігієнічних. До переробки на бринзу допускається лише натуральне нефальсифіковане та пастеризоване молоко з нормальним хімічним складом, що визначає його технологічні властивості. Кращим для сироваріння є літнє молоко, найбільш несприятливим весняне і стародійне [17, 42, 59, 191].

Дослідження показують, що сир містить широкий спектр мікрофлори типу *Lactococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Leuconostoc spp.*, *Enterococcus spp.* так і забруднюючих бактеріальних патогенів. Пастеризація сирого молока має не лише позитивний вплив на вихід сиру, а також захищає споживача від його патогенної мікрофлори [125, 157, 236].

Пастеризацію молока проводять попередньо нагрівши його до 65 °C, що сприятливо впливає на коагуляцію, осадження фосфату кальцію та супутнє зменшення рН. Ці зміни відбуваються також за більш високих температур [163, 253]. Комплекція денатурованого сироваткового білка з κ-казеїном негативно впливає як на ферментативні, так і не-ферментативні етапи коагуляції [205].

Збільшення ступеня денатурації сироваткового протеїну до рівня >15 % за високої термічної обробки молока (наприклад, > 80 °C × 15 с), погіршує характеристики коагуляції сичужного ензиму до такої міри, що молоко непридатне для виробництва сиру [67, 71, 206].

Однією з основних технологічних властивостей молока є його сиропридатність [112, 171, 186]. Це здатність його швидко згортатися під дією молокозгортаючих ензимів з утворенням щільного згустку, який добре відокремлює сироватку і утримує жир [37]. Низька якість і незадовільне зсідання призводять до перевитрат сировини і великих втрат білків через їх перехід в підсирну сироватку. Кращим для сировиробництва є молоко, що належить за сиропридатністю до 1 та 2 типів (тривалість зсідання 10–15 хв). Молоко 3 типу (більше 15 хв) вважається сичужнов'ялим [32, 113, 235].

Молоко стародійних корів, маючи гірко солонуватий смак і знижену кислотність, уповільнює сичужне сквашування і також не придатне для сироваріння, зумовлюючи нерідко спучування сирів [88]. Вміст жиру в молоці має значний вплив на перебіг процесів переробки молока і якість сиру: він надає йому приємний смак, покращує консистенцію, не дає сильно ущільнюватися казеїну, розпушує структуру, сприяє кращому утриманню вологи та збільшує вихід сиру [148, 187]. Пізнє лактаційне молоко (258–280 днів у лактації), здебільшого, дає низьку якість сировини, погану сироватку, високу вологу та зниження молочного жиру. Ці дефекти можуть бути спричинені низьким рівнем молочної лактози та підвищеним рівнем казеїну в сироватці [65, 69, 164].

Також охолодження молока негативно впливає на його сиропридатність [256] за таких аспектів: збільшення тривалості зберігання молока залежно від ступеня і терміну находження його в охолодженому стані; погіршення реологічних властивостей згустку, зокрема зниження його щільності і міцності на розриві; підвищення втрат білка у вигляді сирного пилу; підвищення вологоутримувальної здатності згустку за виробництва твердих і напівтвердих сирів [60, 64].

У гігієнічному відношенні молоко має бути чистим (вільним від грязьових частинок). Воно має згортатися за додавання в нього спирту, не містити соди або будь-яких речовин, що консервують [94, 144]. Відносно мікрофлори до молока висувають особливо високі вимоги – воно не має містити сторонніх мікроорганізмів, здатних змінити нормальний перебіг дозрівання сиру і зумовити вади [55, 259]. Процес отримання сирів високої якості значною мірою залежить від біологічної повноцінності молока, розвиток молочнокислих бактерій може гальмуватися недостатнім вмістом або відсутністю в молоці засвоюваних речовин, необхідних амінокислот, вітамінів, мікроелементів та ін. [215].

Придатність молока для виробництва сиру визначають крім названих вище показників якості також за складом мікрофлори [89, 140]. Молоко

вважають сиропридатним, якщо воно має хороший смак, запах, колір і консистенцію; нормальний вміст складових частин, зокрема білка, жиру і солей; корисну для вироблення сиру мікрофлору і хороше згортання [83, 84, 189, 226].

За вибору молока на сир потрібно також проводити постійний моніторинг сировини на вміст інгібуючих речовин та антибіотиків [1], вміст основних молочних компонентів, кількість соматичних клітин, регулярно перевіряти молочну сировину по бродильній пробі, контролювати кількість спор анаеробних лактозброджуючих та маслянокислих бактерій [32, 80].

Здатність молока до згортання визначають сичуговою пробою. Молоко сиропридатне та доброякісне за мікрофлорою якщо згортається через 20–25 хвилин, а після закінчення 12 годин утворює однорідний, щільний згусток, оточений прозорою сироваткою [190]. Такі вимоги висувають до молока в сироварінні, однак в дійсності, нерідко доводиться використовувати збірне молоко, що не відповідає повною мірою зазначеним умовам щодо свіжості та бактеріального обсіменіння [119, 244].

Наявність кальцієвих солей в молоці необхідно для згортання під дією сичужного ензиму. За недостатньої кількості кальцієвих солей виходить в'ялий сичужний згусток, а в деяких випадках згусток може взагалі не утворюватися [181].

Однією з ключових умов за виробництва сирів є визначення моменту готовності молочного згустку до розрізу. На практиці донині широко використовують суб'єктивний, органолептичний метод визначення готовності молочного згустку до розрізу. Для цього використовують ніж, шпатель, тарілку або просто пальпацію. У будь-якому випадку спочатку роблять розріз згустку, потім піднімають його і якщо згусток дає розкол з цілісними гострими краями і виділяється прозора сироватка із світло-зеленим відтінком, то згусток готовий до розрізу. Якщо це не так, пробу повторюють через деякий час [73, 225].

Щільність згустку залежить від вмісту в молоці казеїну, ступеня зрілості молока, температури згортання, додавання солей кальцію і не залежить від дози

сичужного ензиму [105]. Тривалість згортання молока, залежно від виду сиру, становить від 25 до 60 хв і залежить від різних факторів. Зокрема на швидкість згортання впливають такі фактори: температура згортання, рН середовища, концентрація солей кальцію, доза ферменту та ін. [159, 192].

У коров'ячому молоці містяться всі незамінні амінокислоти, які мають біодоступність 98 %. Основним білком в молоці корів є казеїн, який знаходиться там у вигляді казеїно-кальцієвої солі [92, 111]. Під дією молочної кислоти кальцій відщеплюється від солі казеїну, казеїн випадає за нагрівання в осад (коагулює). Цю властивість використовують за виробництва кисломолочних продуктів [96]. Інший білок альбумін за нагрівання молока до 75 °C і вище згортається і випадає в осад. Водночас випадає в осад і глобулін [91].

Лактоза є основним вуглеводом у молоці ссавців, що відповідає за осмотичну рівновагу між кров'ю і альвеолярним просвітом у молочній залозі. Також вона є основним вільним вуглеводом, який був ідентифікований у молоці кози, хоча також виявлено невелику кількість інозитулу. Концентрація лактози зазвичай вважається нижчою, ніж в коров'ячому молоці, але величину різниці важко оцінити через варіацію методів, що використовують [91].

Якщо порівнювати коров'яче та козине молоко, то за вмістом холестерину козяче молоко має певну відмінність у порівнянні з коров'ячим, яке містить від 14 до 17 мг/100 г молока, тимчасом молоко кози – від 11 до 25 мг/100 грам [124, 196].

Також молоко містить основні макро- та мікроелементи, включаючи Ca, Na, Mg, P, K, Zn, Mn, Se, Co, Cu та Fe відповідно. Молоко кіз є гарним джерелом Кальцію на 13 % більше, ніж у коров'ячому молоці [87, 195].

Харчова цінність молока залежить не лише від вмісту поживних складових, також важливе значення має їх біодоступність. Цінність молочних білків залежить від їх засвоюваності та кількості незамінних амінокислот. Приблизно 80 % білків молока складаються з казеїну (AS1, AS2-, B- та KSHIN). Казеїнмолекули є попередниками декількох біологічно активних пептидів з

антимікробною активністю та векторними властивостями для Кальцію, Цинку, Купруму та Феруму в організмі [109, 165].

Кілька досліджень показують, що сирий молочний сир містить широкий спектр різноманітної мікрофлори, включаючи корисні бактерії, особливо молочні кислотні бактерії. Вони також сприяють більш інтенсивному аромату, ніж у пастеризованих молочних сирів [257]. Ці результати були віднесені до декількох корінних мікроорганізмів, таких як *Lactococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Leuconostoc SPP* та *Enterococcus spp.* Більш того, корінна мікрофлора, особливо молочнокислі бактерії, можуть контролювати проліферацію багатьох забруднювальних бактеріальних збудників і в такий спосіб захищати сири від мікробіологічного ризику [236].

Кислотність використовуваного коров'ячого молока 18–20 °Т, а якщо в суміші з овечим або козячим, буйволячим молоком, то 22–26 °Т. У пастеризоване і охолоджене до температури сквашування молоко вносять хлористий кальцій і бактеріальну закваску, що складається з штамів молочно кислих і ароматоутворювальних стрептококів (0,7–1,5 %) [218]. Сичужну закваску або пепсин вносять з розрахунком згортання молока за температури 28–33 °С впродовж 40–70 хв. Готовий згусток має бути міцним, добре виділяти сироватку. Згусток ріжуть на кубики розміром 15–20 мм і залишають у спокої на 10–15 хвилин, потім з метою ущільнення і зневоднення обережно вимішують його впродовж 20–30 хвилин. Вимішування проводять з 2–3 зупинками на 2–3 хвилини [203].

Друге нагрівання сирної маси за технології бринзи не застосовують. Після достатнього ущільнення сирну масу переміщують на формувальний стіл, покритий марлею в два шари, для самопресування і подальшого підпресування за тиску 5–10 кПа, це відбувається впродовж 2–2,5 годин. Завершення пресування встановлюють з припинення виділення сироватки. Відпресований пласт ріжуть на квадратні шматки розміром граней 15/15 см [81]. Солять бринзу в 20–22 % розсолі з температурою 8–12 °С впродовж 5 діб. Посолену бринзу упаковують в дерев'яні бочки, укладаючи її щільно цілими шматками,

утворені порожнечі по колу бочки заповнюють половинками. Бруски укладають рівними рядами до повного заповнення бочки (5–7 рядів). Після заповнення бочки бринзою, через отвір в днищі заливають її 18 % розсолем та залишають на дозрівання за температури 8–10 °С. Доспілу бринзу зберігають за 6–8 °С. Маркування бринзи, зберігання і транспортування проводять так само, як за вироблення розсільних сирів [116].

У польових умовах, на карпатських полонинах, бринзу готують із свіжовидоєного ненормалізованого овечого та коров'ячого молока. У пастеризоване молоко вносять закваски молочнокислих бактерій у межах 0,8–1,2 % і кальцію хлориду – від 40 до 80 г/100 кг молока [45]. В. Бінкевич у співавт. (2013 р.) запропонував таку технологію виготовлення бринзи з овечого молока. Для цього овече молоко фільтрували через чотири шари марлі, розклавши навколо гілки хвойних дерев. Профільтроване молоко в посудині нагрівали до 35–45 °С та охолоджували. Потім вливали 3–4 столові ложки ензиму на 10 л молока, перемішували та залишали в спокої на 30–40 хв. Далі сир формували вручну, щоб була овальна форма. Потім вийнявши з рідини, прокопчували сухим димом 5–7 днів, після цього нарізали на шматки по 200–250 г, розминали в дерев'яному посуді до сироподібної маси. Додавали 750 г кухонної солі на 32 кг маси та перемішували 3 години. Посолену бринзу набивали щільно в чисті дерев'яні діжечки накриваючи так, щоб не було доступу повітря на 5–15 днів. Після закінчення дозрівання накривали дерев'яною кришкою та зберігали до 3-х років [30].

Н.П. Дерев'янком у 2016 р. було вироблено за технологічною схемою бринзу з вітамінним комплексом (із внесенням таких вітамінів: А, Е, В₁, В₂, В₆, В₁₂, С, фолієва кислота, рутин, нікотинамід). Та доведено, що бринза з додаванням вітамінного комплексу не відрізняється від нормативних вимог, а його внесення покращує органолептичні показники бринзи і збагачує її додатковою кількістю вітамінів [17].

І.В. Скульська та О.Й. Цісарик (2019 р.) у своїх дослідженнях описали про те, як замінили 20 та 30 % кухонної солі на хлорид калію у розсолі та

використали біозахисну культуру *L. rhamnosus*. Це дало змогу продовжити термін зберігання бринзи на 10 діб [40].

1.2. Одержання сичужних ензимів і їх використання в молочній промисловості

У молочній галузі ензими використовують для виготовлення молочних продуктів. Їх властивості широко використовують для коагуляції під час виготовлення сирів та покращення терміну зберігання. Використання ензимів (естераза, лактаза, ліпази, протеази та каталази) у молочних та харчових технологіях добре відоме [9, 51, 70, 78, 178].

Ензими – це функціональні одиниці клітинного метаболізму, або ще їх називають спеціалізовані білки, що містяться в клітинах і позаклітинних рідинах мікроорганізмів, які присутні у всіх живих клітинах і сприяють перетворенню одних речовин (субстратів) в інші (продукти) [58, 182, 184]. Вони слугують каталізаторами практично у всіх біохімічних реакціях, що проходять в живих організмах. До 2013 р. було описано понад 5000 різних ензимів. Також вони можуть бути простими білками (складатися лише з амінокислот) і складними – містять небілковий компонент [41, 103].

Ензими відрізняються за своїми функціями і застосуванням, типом внесення, консистенцією, субстратом, дозуванням, походженням. Усі молокозгортальні ензимні препарати за способом отримання можна розділити на [212, 219, 252]:

- 1) тваринного походження;
- 2) мікробного походження – вегетаріанський;
- 3) рекомбінантний хімозин – вегетаріанський.

Ензими тваринного походження можуть містити в своєму складі хімозин і пепсин в різних співвідношеннях [154]. Від їх співвідношення залежить якість одержуваного згустку, а також підсумкові показники сиру. Також використовують додаткові ензими. Ензими мікробного походження виробляються методом ферментації штаму *Rhizomucor miehei*. У своєму складі

вони, зазвичай, містять лише пепсин [54]. Рекомбінантні ензими – хімічні речовини, виділені з клітин тварин, в основному мікроорганізмів, рослин. Використання технологій рекомбінантних ДНК уможливило виробництво нових ензимів, що використовують в процесах харчових виробництв [110].

Вони беруть участь у розщепленні білків, ліпідів і полісахаридів в шлунково-кишковому тракті, в реакціях внутрішньоклітинного обміну речовин, в утворенні і виведенні з організму кінцевих продуктів обміну, в енергетичних процесах, в знешкодженні токсичних речовин, в синтезі клітинних білків та інших біогенних з'єднань, необхідних для життєдіяльності [132,133, 145].

Джерелами ензимів слугують тканини рослин, тварин і культури мікроорганізмів [161, 175]. Зокрема, трипсин, що виробляється в підшлунковій залозі (pancreas) людини і тварин, а також комплекс протеолітичних ензимів підшлункової залози (панкреатин) застосовуються за хвороб органів травлення і в переробці м'ясних продуктів. Ензими, які відповідають цим вимогам, називають «молокозсідальними ензимами» [139, 202].

Для виробництва сиру придатні молокозсідальні ензими, які здатні швидко розривати зв'язок між гідрофільною і гідрофобною частинами казеїну і не чинити негативного впливу на вихід і органолептичні властивості сирів [151, 240]. Молокозсідальні ензими є необхідним компонентом виробництва натуральних сирів [180, 245, 254].

Сичужний ензим (ренін), що міститься в слизовій оболонці шлунка теляти, необхідний для вироблення сиру [115]. Використання сичужного ензиму у виробництві сирів є одним з найбільших поширених у виробництві молочної продукції. Його традиційно використовують як молоко-коагулянт у молочній промисловості. Завдяки ньому утворюються високоякісні сири з унікальними функціями, тобто з хорошою текстурою та ароматом [47, 238, 261].

За виробництва сиру використовують здебільшого два препарати тваринного походження: сичужний ензим (ренін) і харчовий пепсин [250]. Це протеолітичні ензими, що каталізують гідроліз капа-казеїну на пара-казеїн та

глікомакропептиди, з перенесенням останніх у сироватку і утворенням згустку за допомогою іонів Кальцію. Від одного теляти можна одержати 25 г сировини, а від ягняти – 8 г.

Сичужний ензим містить хімозин і пепсин як єдину активну субстанцію. Ці ензими належать до групи аспарагічних протеїназ, що мають два залишки ASP у своєму активному центрі [127, 148]. Ці шлункові аспарагічні протеїнази секретуються у слизовій формі шлунка у вигляді зомогенів [169, 209].

Хімозин завдяки своїй високоспецифічній активності згортання молока – найважливіший та ідеальний ензим для виготовлення сиру [136, 160]. Висока специфічність хімозину пов'язана з тим, що природою він призначений для коагуляції коров'ячого молока в шлунку підсисних телят без розщеплення імуноглобулінів молока і впливу на засвоєння цих речовин новонародженими телятами [115].

Телячий хімозин зустрічається в трьох формах – А, В і С, зокрема хімозин В представлений в натуральному вигляді та найбільш широко використовується. Хімозин А відрізняється від В заміною лише однієї амінокислоти [234]. Він зазвичай прагне розщеплювати пептидні зв'язки, що з'єднують великі гідрофобні амінокислоти. Asp243 в Хімозин А замінюється Gly243 в Хімозин В. Хімозин С, мабуть, є продуктом розпаду хімозину А, в якому не вистачає трьох залишків, Asp244-Phe246 [102]. Три варіанти показують відмінності в коагулюючій активності, і з трьох форм хімозин А має найвищу специфічну активність коагуляції, а хімозин С – найнижчу. Форми А та В однаково ефективні у виробництві сиру. Хімозин, отриманий із шлунка молочного теляти, найбільш активний за рН 6,2–6,4, а активність пепсину розташовується в області підвищеної кислотності при рН 1,7–2,3, тому він з пепсином доповнюють один одного, а їх суміші знайшли широке застосування в сироварінні [183].

У сичузі пропорції між хімозином і пепсином залежать від віку тварин і типу годівлі. Екстракти ензимів від молодих тварин зазвичай мають великий

вміст хімозину (близько 80–95 % хімозину і 5–20 % пепсину), від дорослих тварин – значно більш високий вміст пепсину (до 80–90 %) [223].

Хімозин можна отримати від інших тварин, мікробних або овочевих джерел, але мікробний хімозин (від грибків або бактерій) неефективний для виготовлення сиру Чеддер та інших жорстких сирів [107, 170]. Сичужний ензим використовують для сирів з високою температурою другого нагрівання (типу Швейцарського) та тривалим терміном визрівання до півроку і більше. У всьому світі ензими екстрагують із сичугів від тварин різного віку та існує багато видів сумішей екстрактів, що призводить до широкої різноманітності асортименту сичужних ензимів [155].

Сичужний ензим тварин отримують методом екстракції висушеної (зазвичай) або засоленої шлункової тканини 10 % розчином NaCl з подальшою стандартизацією екстракту. Стандартний сичужний ензим для телят містить 60–70 RU/ml та зберігається через доведення екстракту до 20 % NaCl і додавання бензоату натрію або пропіоната натрію [98]. Одиниця сичужного ензиму (RU) – це його кількість, яка буде коагулювати 10 мл молока (зазвичай низькотемпературне сухе знежирене молоко, відновлене в 0,01 % CaCl_2 і, можливо, доведене до pH 6,5) за 100 с [48, 104].

Також потрібно перевіряти сичужну активність, яку установлюють за допомогою збірного молока. За одиницю сичужної активності (RU), так звану силу ензиму, беруть кількість молока у кубічних сантиметрах (cm^3), що згорнулося, за температури 35 °C упродовж 40 хв [130, 213]. Наприклад, якщо ензим має активність 150 тис. од., то це означає, що 1 г сичужного ензиму згортає 150 тис. г або 150 кг молока впродовж 40 хв за температури 35 °C. Активність ензиму знижується за підвищення температури його розчину більше ніж 35 °C, а за температури 65 °C фермент повністю інактивується [126].

З метою поліпшення якості ензиму і збільшення виходу після відділення екстракту від залишків сичуга, його очищають сепаруванням і фільтруванням, концентрують, додатково очищають ультрафільтрацією, очищений концентрат використовують в рідкому вигляді або сушать в сублімаційній сушарці [137].

Сичужний фермент відіграє значну роль у сенсорних характеристиках виробленого сиру, оскільки він містить також ліполітичні ензими, які продукують вільні жирні кислоти під час дозрівання [85, 90, 214].

О. Квасенко та В. Пенто (2000 р.) запропонували спосіб отримання сичужного ензиму, що передбачає підготовку сичугів, їх екстрагування соляною кислотою, відокремлення екстракта і виділення із нього цільового продукту. Це відрізняється тим, що в процесі екстрагування суміші диспергує водний розчин натрієвої солі карбонової кислоти.

Дослідники запропонували спосіб виробництва сичужного ензиму, що включає подрібнення сичугів, екстракцію розчином хлористого натрію, внесення консерванту бензоату натрію для запобігання бактеріального росту, відділення рідкої фази, фільтрування. Екстракцію ензиму проводять одноразово 3,0–10,0 % розчином хлористого натрію за температури 35–40 °С впродовж 3–3,5 год та повільного постійного перемішування без додаткового доведення рН, екстракт відокремлюють від сировини, здійснюють активацію сичужного ензиму в екстракті за встановлення рН 4,6–4,7 і витримки його впродовж 8–16 год за температури 25–35 °С, активований екстракт обробляють речовинами, які полегшують і прискорюють процес фільтрування, фільтрують під тиском 0,015–0,02 МПа за температури 20–25 °С, отриманий ензим стабілізують за внесення у фільтрат сухого хлористого натрію до вмісту його в готовому препараті 17–18 % та доведення рН готового препарату до 5,3–7,0 за допомогою 1 н розчину гідроксиду натрію, а консервант бензоат натрію вносять на стадії стабілізації до вмісту його в готовому препараті 0,1–0,5 % [93, 258].

Широке застосування в промисловості отримали молокозгортальні ензимні препарати на основі рекомбінантного хімозина [86, 95, 248]. Структура рекомбінантного хімозину, майже ідентична структурі традиційного телячого [101]. Його отримують через пересадку гена прохімозину із сичугової тканини телят деяким мікроорганізмам. На основі цієї розробки отримані ензимні препарати CHY-Max, Maxiren [44, 217]. На сьогодні великою популярністю у

виробництві сирів користуються альтернативні коагулянти молока, одержані мікробним синтезом і з рослин [211]. З появою мікробних коагулянтів набули поширення такі види молокозгортальних ензимів: грибкові екстракти; бактеріальні екстракти; телячий сичуг + грибковий екстракт; телячий сичуг + бактеріальний екстракт; грибковий екстракт + пепсин; бактеріальний екстракт + пепсин [150].

На сьогодні ензимні препарати (коагулянти) задовольняють приблизно 10 % потреби реніну в світі [200]. Найбільш відомими на світовому ринку мікробними молокозгортальними препаратами є коагулянти «Ренінфі яксія» (Угорщина), «Ренілаза» (Данія), «Фромаза» (Франція), «Супарен» (США), «Мейто» (Японія) [207]. Ензимні препарати мікробного походження за кордоном застосовують лише для виробництва окремих видів сирів [143]. Також слід зазначити, що деякі виробники в сирному виробництві замість натурального сичужного ензиму використовують деякі мікроорганізми, такі як *Aspergillus oryzae*, *Rhizomucor Pusillus*, *Endothia Parasitica* та *Irpex Lactis* [236, 251].

Для подолання проблем від термічної обробки виробники молочних ферментів використали коагулянт R. Mieheli та хімічне окислення, щоб змінити бічні ланцюги метіоніну. Ці ензими можуть бути денатуровані методом пастеризації сироватки, і вони також менш специфічні, ніж протеїназа [176, 231, 246]. Ароматний профіль жорсткого сиру, виготовлений з грибком R. miehei, не такий, як сир з хімозину. Найбільш широко використовувана альтернатива телячим сичужним ензимам у сирній промисловості у всьому світі це хімозин [61, 243]. Його виробляють великомасштабним бродінням GM *Kluyveromyces Lactis* або *Aspergillus niger*. Фермент відносно легко збирати та очистити від культури, на відміну від системи виробництва за допомогою *Escherichia coli* для виробництва хімозину в органах включення [224, 255].

Перевагою використання мікробних і рослинних ферментних препаратів є низька собівартість, а недоліками – низький вихід продукту, більш короткий

термін зберігання у порівнянні із сичужними сирами і зниження якості вироблених сирів [49]. Водночас слід зазначити, що зараз у виробництві все більшою популярністю користується методика багаторазового використання сичужних ферментів – іммобілізація, тобто включення молекул ферменту в якусь ізольовану фазу, яка відокремлена від фази вільного розчину, але здатна обмінюватися з розташованими в ній молекулами субстрату, ефектора або інгібітору [172].

Проте, дорогі високоякісні сири виробляють лише з використанням натурального сичужного ензиму (НСФ) [106, 260].

1.3. Способи стабілізації ензимів

У сучасному виробництві твердих сирів ведеться пошук нетрадиційних прийомів активації дефіцитних і дорогих сичужних ензимів з метою економії останніх за умов збереження якості готової продукції [230]. На сьогодні розроблені технології активації ензимів за допомогою лазерного, інфрачервоного та ультрафіолетового опромінення, перемінного електромагнітного поля надвисокої та наднизької частот, пульсуючого електромагнітного поля, ультразвуку, перемінного та постійного магнітного поля, електромагнітних полів надвисокої напруги, електролізу тощо [228].

Низка факторів може негативно вплинути на активність ензимів, що призводить до погіршення якості ферментації та фінансових збитків для виробника. Коли молочна кислота не виробляється стартовою культурою за бажаною швидкістю, то вона називається «повільна» [249, 258]. Повільність може бути пов'язана із зовнішніми факторами, зокрема: бактеріофаги; залишки антибіотиків та санітологічних агентів; інгібуючі сполуки, що знаходяться в молоці; варіаціями у складі молока через мастит або сезонні фактори, та метаболіти бактерій псування. Низька швидкість кислотного виробництва також може бути зумовлена через коливання інкубації та підкислення [182, 232].

Досягнення стабільності та активності ферментів часто є складним завданням. Їх біологічна активність залежить від тривимірної рідної структури, отже каталітичної активності, і будь-які значні конформаційні зміни можуть призвести до їх інактивації [123, 146].

Прояви ензимної нестабільності виникають від агрегації, втрати біологічної функціональності, і вплив екстремальних умов або навіть незначних варіацій температури або рН можуть зумовити різкі зміни та подальшу втрату їх біологічної активності [222]. Через вплив рН на активність ензиму, час коагуляції збільшується із збільшенням рН, особливо $> \text{pH } 6,4$ [43].

Для стабілізації ензимів використовують наступні способи:

- фізико-хімічні (висушування, зберігання за низьких температур, зміна рН чи тиску);
- вплив хімічних агентів із метою ущільнення (гліцерину, вуглеводів, полісахаридів, іонів металів, детергентів, інгібіторів тощо;
- мікрокапсулювання і гранулювання.

Також існує ряд методів підвищення стабільності вже відомих ензимів або їх препаратів [108]. Ці методи можна розділити на три основні групи:

- а) додавання стабілізуючих речовин до середовища, в якій зберігається ензим або проводиться ферментативна реакція;
- б) хімічна модифікація розчинного білка;
- в) іммобілізація білка на поверхні або в повному обсязі нерозчинного твердого носія або матриц [117].

Для створення умов стабільності (стійкості у зберіганні) сичужного ензиму (хімозину) доводять активну кислотність середовища до 5,9 од. рН за допомогою повільного, обережного додавання 1 н розчину гідроксиду натрію за перемішування, не допускаючи вогнищ залужування [129].

Ензим стабілізують за внесення у фільтрат сухого натрію хлористого до вмісту його в готовому препараті 17–18 % і доведення рН готового препарату до 5,3–7,0 од. рН 1 н розчином гідроксиду натрію, а консервант

бензоат натрію вносять на стадії стабілізації до вмісту в готовому препараті 0,1–0,5 % [68].

Стабільність сичужного ензиму визначається вимірюванням часу згортання за температурного діапазону 25–40 °С, і спостерігаючи мінімальний час згортання між рН 4 та 6 [179, 242]. Нестабільність сичужного ензиму відбувається коли рН менше ніж 3,5 що призводить до втрати 35 % вихідної активності за температури 30 °С. Якщо рН вище 7, ензим втрачає свою активність згортання молока та зазнає конфігураційних змін через зміни в'язкості та ультрафіолетового поглинання.

До речовин, що підвищують стійкість білків, належать субстрати, органічні розчинники і солі. Оскільки активний центр ензиму часто є одночасно і найбільшою лабільною ділянкою його молекули, то наявність субстрату може стабілізувати ензим через закріплення частини молекули білка у вигляді ферментсубстратного комплексу [50]. З іншого боку, відомі випадки дестабілізації ферментів відповідними субстратами. Розчинники типу багатоатомних спиртів, стабілізуючи деякі ензими, можливо, підвищують стійкість внутрішньомолекулярних водневих зв'язків білка [128]. За низьких концентрацій солей (<0,1 М) ряд катіонів, наприклад, Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Mo^{2+} і Cu^{2+} , специфічно взаємодіють з особливими ензимами. Як вже зазначалося раніше, деякі з перерахованих катіонів є кофакторами, і їх наявність стабілізує фермент. Катіон Ca^{2+} бере участь в стабілізації третинної структури ряду білків. Утворюючи іонні зв'язки з двома різними амінокислотними залишками, іони Ca^{2+} можуть виконувати функцію стабілізуючого містка аналогічно дисульфідним зв'язком [168].

Для підвищення стабільності ензимів порівняно успішно використовували також такий важливий інструмент біохімічних досліджень як хімічна модифікація білків [210]. В одному з варіантів цього методу модифікації піддають бічні ланцюги залишків деяких амінокислот, наприклад способом ацилювання, відновного алкілювання або конденсації аміногруп нативного білка з бічними ланцюгами поліамінокислот [156, 221].

Інший варіант хімічних методів стабілізації білків заснований на застосуванні біфункціональних реагентів, наприклад глутарового діальдегіду. Такі реагенти утворюють поперечні зв'язки між аміногрупами білка і в такий спосіб, по-перше, ускладнюють доступ протеаз до білка і, по-друге, можуть закріплювати активну конформацію білкових молекул [120]. Для хімічної стабілізації можуть застосовувати і ДІАМІДА, зв'язують поперечними амідними зв'язками амінні та карбоксильні групи. Ці реагенти і відповідні реакції будуть розглянуті докладніше в процесі вивчення їх застосування для іммобілізації ензимів і отримання технологічних біокаталізаторів [8, 162, 239].

D.G. Libouga (2004) описує, що на початкових етапах додають консервант бензоат натрію (0,1 %) щоб запобігти мікробному зростанню на наступних етапах виробництва, це включає фільтрацію та підкислення, щоб активувати протеолітичні ферменти. Іноді інші стабілізатори, такі як пропіленгліколь, гліцерин та сорбіт, використовують залежно від виробника та країни, в якій продукт будуть використовувати [56].

За виробництва сиру можуть використовуватись іммобілізовані білки, які згортають молоко – ренін та пепсин [142, 193]. Іммобілізація ензимів – включення молекул ферменту в якусь ізольовану фазу, яка відокремлена від фази вільного розчину, але здатна обмінюватися з розташованими в ній молекулами субстрату, еффектора або інгібітору [62]. Це дає наступні переваги: зростання стабільності біотехнологічних процесів, оптимізацію рН для каталітичної активності, отримання продуктів більш чистої реакції, полегшення відновлення і повторного використання біокаталізаторів, пониження інгібування ферментів [208]. Водночас дозволяє зупинити реакцію на будь-якій стадії, отримати продукт очищений від ензиму, що важливо в ряді харчових і промислових виробництв [237].

Поширені методи механічного включення ензимів у полімерні гелі, в напівпроникні полімерні мікрокапсули, в повні волокна, в рідкі мембрани.

Особливий інтерес мають способи, які дозволяють приєднувати ензими до неорганічних носіїв за допомогою хімічних (ковалентних) зв'язків [100, 158].

Зараз у виробництві все більшою популярністю користується методика багаторазового використання сичужних ензимів. Імобілізовані можуть використовуватися багаторазово і забезпечують безперервність ферментативного процесу [198].

Для іммобілізації сичужного ензиму водний екстракт із сичугів телят змішують з розчином поліаміду в оцтовій кислоті за температури 20 ± 2 °C впродовж 2–5 хвилин. Волокна поліаміду виділяють змішуванням оцтового розчину поліаміду з водою та промиванням волокон питною водою до негативної сичужної проби. Коагуляцію казеїну молока іммобілізованим сичужним ензимом проводять в реакторі, який являє собою скляну трубку діаметром 2 см та довжиною 50 см, заповнену іммобілізованим ензимом [66].

Використання інкапсульованих ензимів має переваги завдяки відповідному розподілу ферменту, запобіганню взаємодії з молочними білками, захопленню ферменту та збільшенню термічної стабільності. Фермент у мікрокапсулах фізично відокремлює від субстрату в молоці та сиру під час виробництва сиру, і лише випускається в сирну матрицю за розбиття капсули під час дозрівання [121].

Іонотропне гелентування та поліелектролітна комплексія (IG / PEC) – це новий метод інкапсуляції різних сполук, без використання органічних розчинників, а також високої температури. Цей метод ґрунтується на здатності аніонних полімерів (альгілату) взаємодіяти з моно- або двовалентними катіонами та електростатичною взаємодією між аміновими групами катіонних полімерів (хітозану) та карбоксильних груп альгілату для утворення мікрочастинок або наночастинок, які можуть бути використані щоб інкапсулювати різні інгредієнти [247].

1.4. Висновок з огляду літератури

За літературними даними з'ясовано, що натуральні сири незамінні для забезпечення повноцінного харчування людини. Вони мають високу біологічну цінність, що обумовлена концентруванням, модифікацією компонентів молока. За виробництва сичужних сирів потрібно дотримуватися особливих вимог до молока-сировини. Молоко, що надходить на переробку, має відповідати якісному хімічному складу, фізичним властивостям та мікробіологічним показникам, які є вирішальними факторами, що визначають сиропридатність сировини. Для виробництва бринзи здебільшого використовують коров'яче молоко.

Основну функцію за виробництва сичужних сирів відводять реніну та хімозину, які впливають на згортання молока та утворення молочного зерна. Сичужні ферменти отримують із шлунка молодих телят, оскільки фермент отриманий від дорослих тварин дає гіркуватий смак для сирів. У сучасному харчовому виробництві використовують мікробні та рослинні ферментні препарати, перевагою яких є низька собівартість, а недоліками – низький вихід продукту та короткий термін зберігання у порівнянні з натуральними сичужними сирами. Тому, важливо і необхідно застосовувати натуральний сичужний фермент тваринного походження, який є універсальним для отримання різних видів сирів, особливо доцільно використовувати його у виробництві дорогих сортів сирів.

Наявні літературні дані свідчать про те, що для стабілізації сичужних ферментів можна використовувати методи висушування, зберігання за низьких температурах, зміна рН, хімічні агенти із метою ущільнення, мікрокапсулювання, іммобілізація та гранулювання.

РОЗДІЛ II

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Матеріали, місце проведення досліджень та умови проведення дослідів

Науково-дослідну роботу виконували впродовж 2017–2024 років. Біотехнологію удосконалення виробництва стабілізованих заквасок, модельні дослідження і екстракцію сичужних ензимів проводили в Науково-дослідному інституті тваринництва та харчових технологій Білоцерківського національного аграрного університету (БНАУ).

Амінокислотний склад сироватки та сиру, одержаних за використання стабілізованих заквасок, визначали в ДНДКІ ветеринарних препаратів та кормових добавок м. Львів.

Виробничу перевірку одержаних експериментальних даних, впровадження результатів дослідження виконували в умовах ТОВ Земля Томилівська, ПП Західний Буг.

Дослідження проводили за загальної схеми (рис. 2.1), робота складалась із трьох етапів. На першому етапі удосконалювали технологію одержання стабілізованих сичужних ензимів для виробництва сиру. Вивчали вплив різних екстрагентів (поєднання кислот та солей) на екстракцію хімозину із сичугів від телят різного віку.

На другому етапі розробляли елементи стабілізації сичужних ензимів із застосуванням різних носіїв. Встановлювали нешкідливість та токсичність стабілізованих сичужних ензимів. На третьому етапі досліджували ефективність використання стабілізованих сичужних ензимів за технології бринзи.

Перед встановленням оптимального екстрагента відпрепаровані сичуги молочних телят ретельно промивали, подрібнювали та висушували за різних температурних режимів, що дозволяє отримати біоматеріал максимально придатний як до екстракції, так і до пролонгованого зберігання.

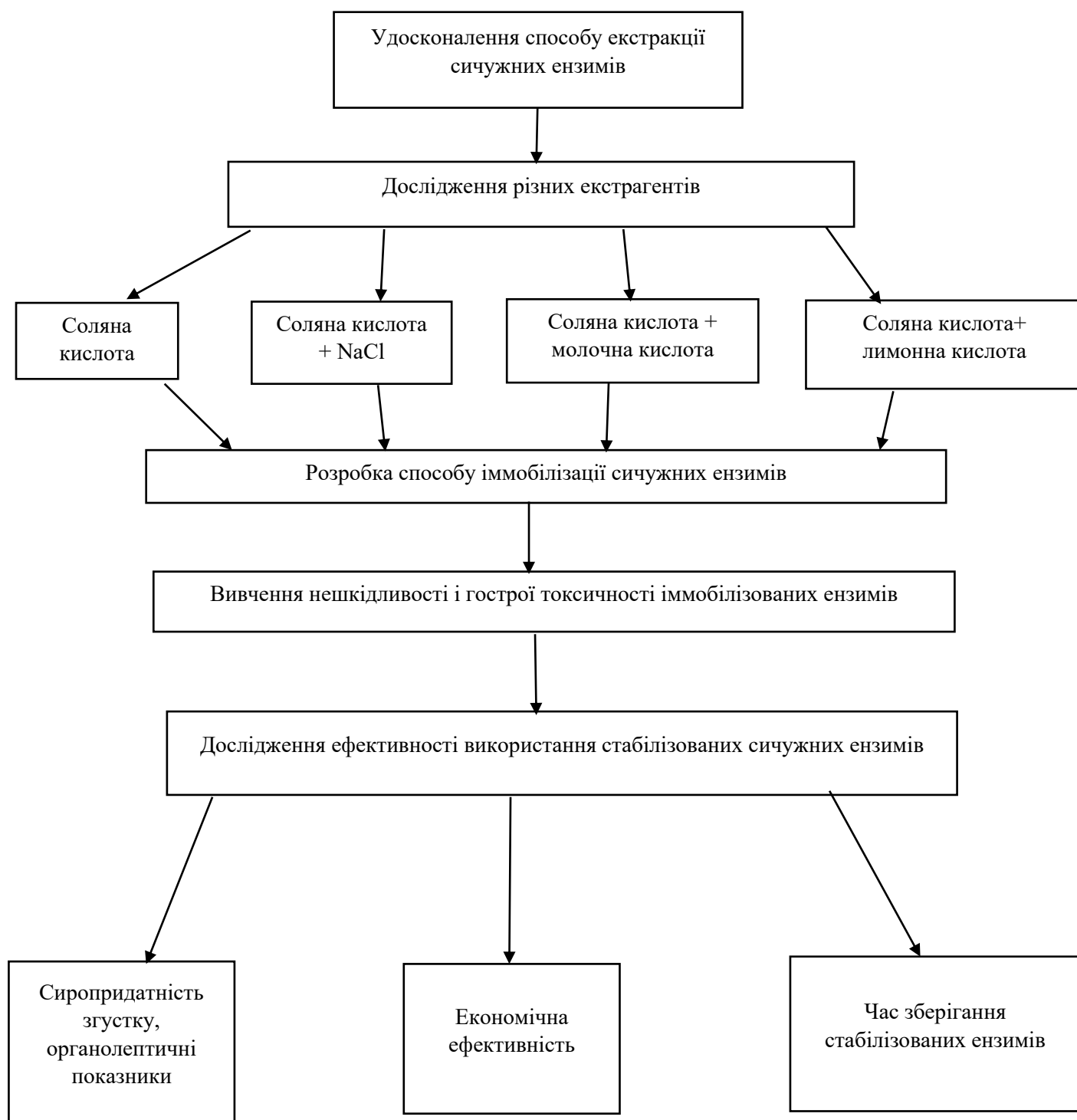


Рис. 2.1. Загальна схема досліджень

Під час відпрацювання технології екстракції сичужних ензимів досліджували вплив розчинів екстрагентів із різним вмістом соляної кислоти (табл. 2.1). З цією метою у 10,0 см³ дистильованої води перемішували 0,2 г

гомогенату сичуга і додавали різні дози 6Н розчину HCl.

У першій дослідній групі до суміші гомогенату сичуга не вносили розчин соляної кислоти. У II та III дослідних групах до суміші гомогенату додавали, відповідно, по 0,2 см³ та 0,4 см³ 6Н розчину HCl. До сумішей із IV дослідної групи додавали по 0,6 см³ розчину кислоти. У V та VI дослідних групах об'єм соляної кислоти у суміші із гомогенатом сичуга був на рівні 0,8 та 1,0 см³.

Таблиця 2.1

Схема дослідження впливу соляної кислоти на екстракцію сичужних ензимів

Група проб	Маса гомогенату сичугів у одній пробі, г	Об'єм дистильованої води в одній пробі, см ³	Об'єм 6Н розчину соляної кислоти у пробі, см ³
Контрольна	0,2±0,002	10,0	-
I дослідна	0,2±0,001	10,0	0,2
II дослідна	0,2±0,003	10,0	0,4
III дослідна	0,2±0,004	10,0	0,6
IV дослідна	0,2±0,003	10,0	0,8
V дослідна	0,2±0,002	10,0	1,0

На наступному етапі удосконалення технології одержання сичужних ензимів вивчали вплив екстракції ензимів із біоматеріалу за дії суміші кислот. Для цього застосовуючи гомогенат із сичугів було сформовано 6 груп проб: контрольну і 5 дослідних (табл. 2.2). У контрольній групі екстракцію із гомогенату сичугів проводили за допомогою додавання до 0,2 г біоматеріалу 10,0 см³ дистильованої води та 0,8 см³ 6Н розчину соляної кислоти. У дослідних групах проб сичужні ензими екстрагували із 0,2 г гомогенату сичугів за додавання 10,0 см³ дистильованої води, 0,8 см³ 6Н розчину соляної кислоти та 0,08; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25 і 0,30 см³ 40,0 % молочної кислоти за постійного перемішування.

Таблиця 2.2

**Схема досліду впливу суміші соляної та молочної кислоти на показники екстракції
сичужних ензимів, n=10**

Група проб	Гомогенат із сичугів у одній пробі, г	Розчин соляної кислоти у пробі, см ³	Дистильована вода, см ³	Розчин молочної кислоти, см ³
Контрольна	0,2	0,8	10,0	-
I дослідна	0,2	0,8	10,0	0,08
II дослідна	0,2	0,8	10,0	0,10
III дослідна	0,2	0,8	10,0	0,15
IV дослідна	0,2	0,8	10,0	0,20
V дослідна	0,2	0,8	10,0	0,25
VI дослідна	0,2	0,8	10,0	0,30

Екстракцію ензимів проводили впродовж 12 год за температури +5 °С із постійним перемішуванням.

Поряд із дослідженням впливу суміші соляної і молочної кислот встановлювали показники екстракції сичужних ензимів за дії лимонної та соляної кислот (табл. 2.3).

Таблиця 2.3

**Схема досліду впливу суміші соляної та цитратної кислоти на показники
екстракції сичужних ензимів, n=10**

Група проб	Гомогенат із сичугів у одній пробі, г	Розчин соляної кислоти у пробі, см ³	Дистильована вода, см ³	Розчин цитратної кислоти, см ³
Контрольна	0,2	0,8	10,0	-
I дослідна	0,2	0,8	10,0	0,05
II дослідна	0,2	0,8	10,0	0,10
III дослідна	0,2	0,8	10,0	0,15
IV дослідна	0,2	0,8	10,0	0,20
V дослідна	0,2	0,8	10,0	0,25
VI дослідна	0,2	0,8	10,0	0,30

У контрольній групі екстракцію ензимів проводили лише за допомогою розчину соляної кислоти. У I дослідній групі до суміші гомогенату сичугів із соляною кислотою та дистильованою водою вносили по 0,05 см³ 40,0 % розчину лимонної кислоти. У II–VI дослідних групах проб вміст лимонної кислоти становив від 0,15 до 0,30 см³. Екстракцію ензимів проводили впродовж 12 год. за температури +5 °С за постійного перемішування.

Вплив суміші розчину соляної кислоти із кухонною сіллю на показники екстракції ензимів із гомогенату сичугів визначали за схемою, наведеною у табл. 2.4.

Таблиця 2.4

Схема досліду впливу суміші соляної кислоти та хлориду натрію на показники екстракції сичужних ензимів, n=10

Група проб	Гомогенат із сичугів у одній пробі, г	Розчин соляної кислоти у пробі, см ³	Дистильована вода, см ³	Стерильна сіль NaCl, мг
Контрольна	0,2	0,8	10,0	—
I дослідна	0,2	0,8	10,0	5,0
II дослідна	0,2	0,8	10,0	10,0
III дослідна	0,2	0,8	10,0	15,0
IV дослідна	0,2	0,8	10,0	20,0
V дослідна	0,2	0,8	10,0	25,0
VI дослідна	0,2	0,8	10,0	30,0

У контрольній групі проб екстракцію сичужних ензимів проводи без додавання хлориду натрію. У дослідних групах екстрагування ензимів гомогенату біоматеріалу здійснювали за додавання 10,0 см³ дистильованої води, 0,8 см³ 6Н розчину соляної кислоти та 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0 і 30,0 мг хімічно чистої харчової солі. Екстракцію ензимів проводили впродовж 12 год. за температури +5 °С із постійним перемішуванням.

Одержані екстракти ензимів піддавали спектроскопії для визначення

залишкових кількостей білка. Перед спектрофотометрією екстрактів, отриманих за використання розчину однієї соляної кислоти, суміші соляної кислоти із молочною кислотою, суміші соляної кислоти із лимонною кислотою та суміші соляної кислоти із хлоридом натрію, проводили очищення їх за допомогою центрифуги за частоти обертів 7–8 тис. об./хв впродовж 10 хвилин, потім екстракт фільтрували і повторно центрифугували протягом 5 хвилин.

Досліджуючи вплив величини часток на показники екстракції сичужних ензимів вивчали різні фракції. У I дослідній групі величина часток становила 0,03-0,4 мм. У II–IX дослідних групах для екстракції використовували подрібнені сичуги із величиною часток від 0,03–0,6 до 0,03–2,0 мм (табл. 2.5).

Таблиця 2.5

Схема досліду впливу величини часток сичуга на показники екстракції ензимів.

Група проб	Розмір часток, мм
I дослідна	0,03–0,4
II дослідна	0,03–0,6
III дослідна	0,03–0,8
IV дослідна	0,03–1,0
V дослідна	0,03–1,2
VI дослідна	0,03–1,4
VII дослідна	0,03–1,6
VIII дослідна	0,03–1,8
IX дослідна	0,03–2,0

Вплив часу культивування подрібнених сичугів у розчині кислот на показники елімінації ензимів проводили за схемою, наведено у табл. 2.6.

Таблиця 2.6

Схема дослідження часу екстракції на показники елімінації сичужних ензимів.

Група проб	Час екстракції, год
I дослідна	6,0
II дослідна	8,0
III дослідна	10,0
IV дослідна	12,0
V дослідна	14,0
VI дослідна	16,0
VII дослідна	18,0
VIII дослідна	20,0
IX дослідна	22,0

У I дослідній групі період екстракції тривав 6,0 годин. У наступних дослідних групах (II–IX) час збільшували на 2 години – від 8,0 до 22,0 год.

Досліджуючи співвідношення маси сичуга до об'єму екстрагента, за яким екстракція має проходити оптимально до сталої маси біоматеріалу вносили різні об'єми екстрагента, який складався із розчину соляної та молочної кислот. У контролі співвідношення становило 1 до 55,25 (табл. 2.7).

Таблиця 2.7

Схема встановлення оптимального гідромодуля

Група проб	Маса гомогенату сичугів у пробі, г	Об'єм розчину соляної кислоти у пробі, см ³	Об'єм дистильованої води, см ³	Об'єм розчину молочної кислоти, см ³
Контрольна	0,2	0,80	10,0	0,250
I дослідна	0,2	0,72	9,0	0,225
II дослідна	0,2	0,64	8,0	0,200
III дослідна	0,2	0,56	7,0	0,175
IV дослідна	0,2	0,48	6,0	0,150
V дослідна	0,2	0,40	5,0	0,125
VI дослідна	0,2	0,32	4,0	0,100
VII дослідна	0,2	0,24	3,0	0,075
VIII дослідна	0,2	0,16	2,0	0,050
IX дослідна	0,2	0,08	1,0	0,025
X дослідна	0,2	0,04	0,5	0,012

У І–Х дослідних групах співвідношення маси сичуга до екстрагента становило від 1 : 49,72 до 1 : 2,76. Ефективність екстракції оцінювали за вмістом загального білка у екстракті.

Стабілізацію сичужних ензимів проводили методом адсорбції на розчинних носіях (суха сироватка, сухе молоко) за наявності кальцію хлориду. Стабілізацію проводили за допомогою перемішування носія із розчинною формою ензимів.

Визначали оптимальні умови стабілізації ензимів (*in vitro*), оптимальне співвідношення матриця: ензими, методом експериментального підбору різних концентрацій компонентів, за яких стабілізовані ферменти мали найбільшу активність.

Для виявлення оптимального співвідношення матриця: до розчинених ензимів від 1,0 до 10,0 см³, отриманих за співвідношення вода+розчин соляної кислоти+ розчин молочної кислоти (16,57 за об'ємом) : гомогенат сичугів (1 за масою) давали носії по 1000,0 мг. Кількість спейсера (зшивки) у всіх варіантах була однаковою по 0,25 см³ розчину 0,1 М CaCl₂ (табл. 2.8).

Таблиця 2.8

Співвідношення складників для іммобілізації сичужних ензимів, n=4

Маса матриці, мг	Розчин ензимів отриманий із гомогенату сичугів після фільтрації, см ³	Об'єм розчину 0,1 М CaCl ₂ , см ³
1000,0	1,0	0,25
1000,0	2,0	0,25
1000,0	3,0	0,25
1000,0	4,0	0,25
1000,0	5,0	0,25
1000,0	6,0	0,25
1000,0	7,0	0,25
1000,0	8,0	0,25
1000,0	9,0	0,25
1000,0	10,0	0,25

Сушіння іммобілізованих ензимів проводили за активного вентилявання і перемішування.

Для встановлення нешкідливості стабілізованих сичужних ензимів із самок лінійних білих мишей (вік 57–58 діб) із масою тіла 18,0–18,5 г за випадкового підбору формували три групи по п'ять голів у кожній. Фізіологічний розчин та досліджувані розчини стабілізованих ензимів мишам вводили внутрішлунково за допомогою одноразових шприців із застосуванням металевих зондів.

Тваринам із контрольної групи вводили по 0,25 см³ фізіологічного розчину. Мишам з I дослідної групи вводили по 0,25 см³ 15,0 % розчину стабілізованих сичужних ензимів. Дослідним тваринам із II дослідної групи вводили по 0,25 см³ 30,0 % розчину стабілізованих сичужних ензимів (табл. 2.9).

Таблиця 2.9

Схема встановлення нешкідливості стабілізованих ензимів

Група	Кількість тварин у групі, гол.	Умови введення факторів дослідження
Контрольна	5,0	Внутрішньошлункове введення фізіологічного розчину у дозі 0,25 см ³
I дослідна	5,0	Внутрішньошлункове введення 15,0 % розчину стабілізованих сичужних ензимів у дозі 0,25 см ³ на голову
II дослідна	5,0	Внутрішньошлункове введення 30,0 % розчину стабілізованих сичужних ензимів у дозі 0,25 см ³ на голову

Мишей під час карантину і проведення досліджень утримували у спеціальних клітках, де був постійний доступ до води та корму. Під час проведення експерименту спостерігали за поведінкою, зовнішнім станом, споживанням комбікорму та води тваринами.

Спостереження за мишами здійснювали продовж 10 діб від дати введення ензимів. По завершенню дослідження за використання наркозу тварин проводили забій, здійснювали патолого-анатомічні дослідження стану внутрішніх органів і відбирали проби біоматеріалу.

Встановлення гострої токсичності стабілізованих сичужних ензимів проводили у два етапи – орієнтовного та розгорнутого. Групи формували із мишей із масою тіла 21,5–22,0 г одної статі. Розчини стабілізованих ензимів приготовлених на 1,0 % крохмалі тваринам вводили одноразово внутрішньошлунково. За 7 годин до введення розчинів для мишей організовували голодну дієту за вільного доступу до напувалок із водою. Кожна група нараховувала по чотири голови мишей.

Під час проведення орієнтовного дослідів тваринам внутрішньошлунково вводили дози, які містили 25, 250 та 5000 мг стабілізованих ензимів на кг маси тіла. За проведення розгорнутого дослідів мишам вводили дози 2000, 3000, 4000 та 5000 мг/кг живої маси. Спостереження за мишами тривало 14 діб.

Повторне вивчення гострої токсичності стабілізованих сичужних ензимів здійснювали із використанням лінійних щурів 120–125-добового віку із масою тіла 173,0–179,0 г, яких продовж 14 діб витримували на карантині. Умови проведення досліджень були аналогічними, що і на білих мишах.

За вивчення гострої токсичності стабілізованих сичужних ензимів утримання та годівлю лінійних мишей і щурів забезпечували згідно із загальноприйнятими нормами [18].

Розчин стабілізованих сичужних ензимів вводили у шлунок білих мишей та щурів за допомогою шприців із металевими зондами натщесерце. Рівень токсичності стабілізованих ензимів встановлювали, керуючись [18].

Встановлення впливу умов і часу зберігання на активність іммобілізованих та нативних сичужних ензимів проводили продовж 36 місяців. Частина ензимів зберігали за температури 2–4 °С, другу частину за температури 17–22 °С (табл. 2.10).

Таблиця 2.10

Встановлення активності ензимів, які зберігали за температури 2,0–4,0 °C та 17,0–21,0 °C

Ензими	
Нативні	Імобілізовані
Дослідження активності ензимів через 3 місяці після зберігання	Дослідження активності ензимів через 3 місяці після зберігання
Дослідження активності ензимів через 6 місяців після зберігання	Дослідження активності ензимів через 6 місяців після зберігання
Дослідження активності ензимів через 9 місяців після зберігання	Дослідження активності ензимів через 9 місяців після зберігання
Дослідження активності ензимів через 12 місяців після зберігання	Дослідження активності ензимів через 12 місяців після зберігання
Дослідження активності ензимів через 15 місяців після зберігання	Дослідження активності ензимів через 15 місяців після зберігання
Дослідження активності ензимів через 18 місяців після зберігання	Дослідження активності ензимів через 18 місяців після зберігання
Дослідження активності ензимів через 21 місяць після зберігання	Дослідження активності ензимів через 21 місяць після зберігання
Дослідження активності ензимів через 24 місяці після зберігання	Дослідження активності ензимів через 24 місяці після зберігання
Дослідження активності ензимів через 27 місяців після зберігання	Дослідження активності ензимів через 27 місяців після зберігання
Дослідження активності ензимів через 30 місяців після зберігання	Дослідження активності ензимів через 30 місяців після зберігання
Дослідження активності ензимів через 33 місяці після зберігання	Дослідження активності ензимів через 33 місяці після зберігання
Дослідження активності ензимів через 36 місяців після зберігання	Дослідження активності ензимів через 36 місяців після зберігання

Через кожні 3 місяці відбирали проби ензимів і виготовляли за їх участі бринзу.

Дослідження технології бринзи за використання іммобілізованих ензимів проводили у порівнянні із ензимами, отриманих різними способами. У контролі

для згортання молока використовували сичужний ензим, який має мікробіальне походження. У I дослідній групі проб використовували ферментний препарат, екстрагований із сичугів молочних телят за допомогою сольового методу. Згортання проб молока у II дослідній групі проводили застосовуючи сичужні ензими, екстраговані із використанням суміші кислот (соляна + молочна кислота) з подальшою їх стабілізацією (табл. 2.11).

Таблиця 2.11

Схема дослідження ефективності використання стабілізованих сичужних ензимів за технології сиру

Група проб	Фактор, що досліджується
Контрольна	Технологія бринзи із застосуванням сичужного ензиму мікробіального походження
I дослідна	Технологія бринзи із застосуванням ферментного препарату екстрагованого із сичугів молочних телят сольовим методом
II дослідна	Технологія бринзи із застосуванням стабілізованого ферментного препарату, екстрагованого із сичугів молочних телят за допомогою суміші розчинів соляної та молочної кислот

2.2. Методи дослідження показників

Титровану кислотність сироватки визначали титруванням за використання розчину лугу. Активну кислотність визначали на рН-метрі з похибкою вимірювання 0,05 од.рН. Масову частку води у згустках визначали експрес-методом у шафі для сушіння та методом згідно з [20].

Перевірку метаболічних процесів в організмі лабораторних тварин за дії іммобілізованих сичужних ензимів проводили в печінці та крові.

Кров лабораторних тварин стабілізували гепарином. У крові лабораторних тварин визначали вміст гемоглобіну за методикою, описаною у [7].

Гостру токсичність та нешкідливість іммобілізованих сичужних ензимів визначали згідно із [18]. У печінці тварин визначали: активність аспартатамінотрансферази (АсАт) і аланінамінотрансферази (АлАт) – за методикою S. Reitman, S. Ffrancel [204], лужної фосфатази – за методикою S.

King [147], вміст загального білка – за методикою О.Н. Lowry [167], загальних, білкових сульфогідрильних груп і HS-груп низькомолекулярних сполук – за методикою G.L. Ellman [99].

Сенсорні показники сиру визначали згідно з нормативним документом [20].

Масову частку жиру визначали згідно з ДСТУ ISO 11870:2007 [18, 21]. Мікробіологічні дослідження проводили згідно з [22], амінокислотний склад молока, сироватки та сиру визначали використовуючи метод капілярного електрофорезу згідно з методикою, описаною у рекомендаціях за загальною редакцією І.Я. Коцюмбаса [26].

Експерименти на лабораторних тваринах було виконано згідно з вимогами Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, що використовуються для дослідних цілей [23, 24].

Реологічні показники бринзи (відносна еластичність, відносна пластичність, відносна пружність, показник вискоеластичного модуля та умовно миттєвий модуль пружності) визначали згідно з методиками описаних у [31, 33].

Чисельність молочнокислих паличок і коків визначали методом посіву серійних розведень на відповідне живильне середовище (MSA) згідно ГОСТ 10444.11-89.

Експериментальні дані статистично обробляли за методикою Монцевічюте-Ерингене. Статистично значущу різницю між середньоарифметичними даними встановлювали за критеріями Стьюдента.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Відпрацювання технології екстракції сичужних ензимів

3.1.1. Встановлення впливу віку телят на активність їх сичужних ензимів

Для експерименту було відібрано 6 усереднених проб сичужних ензимів, отриманих від телят 2-, 4-, 8-, 12-, 16- та 18- тижневого віку (I, II, III, IV, V та VI проби). За допомогою сичужних ензимів сквашували молоко корів, слідкували за швидкістю утворення згустку, його органолептичними показниками та титрованою кислотністю сироватки.

Експериментально встановлено, що за дії I-ї проби сичужних ензимів згортання молока розпочалось через 19 хвилин після їх додавання (табл. 3.1.). Внесення у молоко ензиму, отриманого із сичугів телят 4-х тижневого віку привело до утворення згустку на 2 хвилини пізніше порівняно із I-ю пробю. Використання ензимів екстрагованих із біоматеріалу телят (вік 8 тижнів) призводить до пролонгування часу згортання молока відносно I-ї проби на чотири хвилини.

Час початку утворення молочного згустку подовжується у варіантах, де використовували сичужні ензими від телят віком 12 та 16 тижнів. Порівнюючи із варіантом де використовували сичужні ензими від телят віком 8 тижнів час збільшується, відповідно, на 3,0 та 5,0 хвилин.

Отже встановлено, що початок утворення молочного згустку залежить від якості сичужних ензимів. Чим вік телят, від яких відбирають сичуги менший тим сичужні ензими екстраговані із такого біоматеріалу швидше приводять до згортання молока.

Також було встановлено зміни титрованої кислотності сироватки молока. За використання сичужних ензимів, екстрагованих із сичугів телят віком 2 тижні, титрована кислотність сироватки становила 24 °Т. За внесення ензимів із сичугів телят 4- та 8- тижневого віку суттєвих відхилень щодо показника титрованої кислотності сироватки у порівнянні із I-ю пробю не встановлено.

Під час сквашування молока ензимами у V- і VI-й пробах кислотність сироватки молока підвищувалась на 4,1 та 4,6 % відносно варіанта де використані ензими із сичугів телят 2-тижневого віку.

Тому можна вважати, що вік телят від яких відбирають сичуги впливає не лише на час початку утворення згустку, а також на кислотність сироватки, яка утворилась.

Час утворення та якість молочного згустку, n=5

Таблиця 3.1.

Проба	Час початку утворення згустку хв.	Якість молочного згустку	Кислотність сироватки (°Т) через 2 год.	Органолептичні показники згустку
I	19 ±2	Щільний, добре ріжеться	24±0,10	Типовий молочний запах та смак
II	21±0,5	Щільний, добре ріжеться	24,2±0,35	Типовий молочний запах та смак
III	23±0,8	Щільний, добре ріжеться	24,4±0,38	Типовий молочний запах та смак
IV	26±0,6	Щільний, добре ріжеться	24,8±0,20	Типовий молочний запах та смак
V	28±0,4	Щільний, добре ріжеться	25,0±0,34	Кислуватий молочний запах, смак типовий
VI	30±0,7	Щільний, добре ріжеться	25,1±0,10	Кислуватий молочний запах, смак типовий

Стосовно органолептичних показників усі зразки мали типовий молочний запах, колір та смак, окрім згустків, які утворилися за дії ензимів, відібраних від телят віком 18 та 20 тижнів, вони мали більш кислуватий запах.

3.1.2. Встановлення оптимального екстрагента

За використання дистильованої води вміст екстрагованих білків був на рівні 28,0 мг/дм³. Внесення до 10,0 см³ дистильованої води 0,2 см³ 6Н соляної кислоти призводить до підвищення екстракції білків на 18,2 % (табл. 3.2.).

Рівень екстракції ензимів за показником концентрації загального білка *Таблиця 3.2.*

Група проб	Вміст загальних білків, мг/дм ³
Контрольна	28,0 ± 1,14
I дослідна	33,1 ± 1,07
II дослідна	35,1 ± 1,24*
III дослідна	36,7 ± 1,17*
IV дослідна	38,4 ± 1,14**
V дослідна	37,2 ± 1,12**

Примітка: * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$ відносно контролю.

У екстракті із II-ї дослідної групи вміст білка був вищим на 25,3 % відносно показника у контролі. За використання під час екстракції 0,6 см³ соляної кислоти показник екстракції сичужних ензимів збільшується на 31,0 % відносно контролю. Із збільшенням дози розчину соляної кислоти до 0,8 см³ показник екстракції білків, зокрема сичужних ензимів, зростає на 37,1 % відносно показника у контрольній групі. За найбільшої дози соляної кислоти у екстрагенті (V-та дослідна група проб) вміст білка був вищий порівнюючи із III-ю дослідною групою і нижчим відносно даних IV-ї дослідної групи, відповідно, на 1,3 та 3,1 %.

Отже, доведено, що найвищий вміст екстрагованих білків, зокрема сичужних ензимів, було отримано за співвідношення 0,2 г : 10,0 см³ : 0,8 см³ (гомогенат сичугів : об'єм дистильованої води : об'єм соляної кислоти).

По завершенню екстракції, яка тривала 12 год., визначали вміст білка у розчинах за екстракції ензимів суміш'ю соляної та молочної кислоти. У контролі де для екстракції застосовували лише розчин соляної кислоти вміст білка становив 38,2 мг/дм³ (табл. 3.3).

Показники екстракції сичужних ензимів сумішшю соляної і молочної кислоти за вмістом білка

Таблиця 3.3.

Група проб	Вміст загальних білків, мг/дм ³
Контрольна	38,2±1,33
I дослідна	43,2±1,02*
II дослідна	52,2±1,16**
III дослідна	65,4±1,03***
IV дослідна	72,1±1,14***
V дослідна	89,8±1,24***
VI дослідна	78,6±1,44***

Примітка: * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,0$; *** $P \leq 0,001$ відносно контролю

Встановлено, що із додаванням розчину молочної кислоти вміст загального білка, зокреам сичужних ензимів, у екстракті був вищий ніж у контролі. За додавання 0,08 см³ молочної кислоти вміст білка у екстракті був вищим ніж у контролі на 13,0 %. У II-й дослідній групі вміст білка був вищим ніж у контрольній групі на 36,6 %. Екстракція сичужних ензимів сумішшю кислот у III-й дослідній групі призводить до підвищення вмісту білків у розчині на 71,2 % відносно контролю. Найвищий показник екстракції спостерігався у V-й дослідній групі проб за додавання 0,25 см³ молочної кислоти і переважав показник у контролі у 2,35 рази. Стосовно VI-ї дослідної групи проб слід зазначити, що внесення 0,30 см³ молочної кислоти не дає змоги отримати статистично значущого збільшення екстракції ензимів із гомогенату сичугів.

Отже, результати досліджень свідчать про те, що додавання молочної кислоти в екстрагент позитивно впливає на екстракцію ензимів із гомогенатів сичугів.

Аналізуючи вміст білка у екстракті доведено, що у контрольній групі проб цей показник становив 39,0 мг/дм³. За додавання до розчину 0,05 см³ лимонної кислоти показники вмісту білка збільшуються на 12,8 % відносно показника у контролі (табл. 3.4.).

Показники екстракції сичужних ензимів сумішшю соляної і лимонної кислоти за вмістом білка *Таблиця 3.4.*

Група проб	Вміст загальних білків, мг/дм ³
Контрольна	39,0±1,45
I дослідна	44,0±2,13
II дослідна	48,5±2,34*
III дослідна	53,6±2,53*
IV дослідна	65,2±3,11**
V дослідна	66,2±2,98**
VI дослідна	66,3±3,27**

Примітка: * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$ відносно контролю.

У екстрагенті у II-й дослідній групі вміст ензимів (за показником загального білка) був вищим ніж у контрольній групі на 24,3 %. Використання у складі екстрагента 0,15 см³ лимонної кислоти супроводжувалось підвищенням вмісту білка у розчині відносно контролю на 37,4 %. Екстракт із IV-ї дослідної групи проб містив більший вміст білка відносно контролю і III-ї дослідної групи, відповідно, на 67,1 та 10,5 %. За використання у складі екстрагента 0,25 см³ лимонної кислоти вміст загального білка збільшувався на 1,5 та 69,7 %, відносно IV-ї та контрольної груп проб. За найбільшого вмісту лимонної кислоти у екстрагенті (VI-та дослідна група) вміст загального білка був вищим ніж у контрольній групі на 70,0 %. Різниця із показником з V-ї дослідної групи проб була незначною на рівні 0,1 %. отже, враховуючи економічні принципи оптимальним вмістом лимонної кислоти у екстрагенті є 0,25 см³.

За показниками екстракції сичужних ензимів сумішшю соляної кислоти із лимонною у порівнянні із показниками отриманими за використання розчину соляної кислоти із молочною встановлено зменшення вмісту білка у екстракті на 35,4 % за використання у екстрагенті лимонної кислоти.

Досліджуючи показники екстракції сичужних ензимів було встановлено, що у контролі вміст білка у екстракті становив 38,5 мг/дм³. За додавання до екстрагента 5,0 мг натрію хлориду вміст сичужних ензимів (за показником білка) у екстракті підвищується на 2,5 % (табл. 3.5).

Показники екстракції сичужних ензимів сумішшю соляної кислоти і хлориду натрію за вмістом білка

Таблиця 3.5.

Група проб	Вміст загальних білків, мг/дм ³
Контрольна	38,5±1,17
I дослідна	39,5±1,85
II дослідна	40,1±1,12
III дослідна	40,5±2,21
IV дослідна	42,3±1,16
V дослідна	44,5±1,14*
VI дослідна	44,9±1,08*

Примітка: * $P \leq 0,05$ відносно контролю.

У II-й дослідній групі вміст загальних білків був вищим, відповідно, на 4,1 та 1,5 % відносно контрольної та I-ї дослідної групи проб. Із підвищенням у розчинні соляної кислоти вмісту натрію хлориду до 15,0 мг вміст білка у екстракті зростає у порівнянні з контрольною та II-ю дослідною групами, відповідно, на 5,1 та 0,9 %. Різниця не мала статистично значущого прояву.

Виявлено збільшення на статистично не значущу величину вмісту білка у екстрагенті із IV-ї дослідної групи у порівнянні із контролем. За підвищення вмісту натрію хлориду у розчині соляної кислоти до 25,0 мг встановлено статистично значуще збільшення вмісту загального білка у екстракті із V-ї дослідної групи відносно контрольної групи. Різниця між групами становила 15,5 %. Порівнюючи із I-IV-ю дослідними групами вміст загального білка у V дослідній групі був вищим, відповідно, на 12,6-5,2 %. Найвищий вміст загального білка був виявлений у VI-й дослідній групі, де до розчину соляної кислоти додавали 30,0 мг натрію хлориду. Різниця із контрольною групою мала статистичну значущість.

Аналізуючи найвищий вміст загального білка у екстракті, отриманого за використання розчину соляної кислоти із вмістом 30,0 мг натрію хлориду було виявлено, що цей показник був менший, відповідно, на 32,2 та 50,0 % у порівнянні із максимальними показниками вмісту загального білка у екстрагентах отриманих за використання суміші соляної кислоти із лимонною та суміші соляної кислоти із молочною.

Порівнюючи різні екстрагенти (розчин соляної кислоти + молочна кислота; розчин соляної кислоти + лимонна кислота; розчин соляної кислоти + натрій хлорид) найефективнішим екстрагентом виявилась суміш соляної і молочної кислот.

Результати цих досліджень відображені у наукових працях [3, 4, 28, 177].

3.1.3. Відпрацювання оптимальних режимів екстракції ензимів (подрібнення, час екстракції)

Після встановлення оптимального екстрагента наступним етапом роботи було відпрацювання технологічних режимів екстракції сичужних ензимів. Для поставленого завдання було сформовано 9 дослідних груп (n=4), де біоматеріал подрібнювали до різних розмірів (табл. 3.6).

Вплив розміру часток сичуга на показники екстракції ензимів

Таблиця 3.6.

Група проб	Розмір часток, мм	Вміст загальних білків, мг/дм ³
I дослідна	0,03-0,4	89,5±1,88
II дослідна	0,03-0,6	89,8±0,97
III дослідна	0,03-0,8	88,3±1,07
IV дослідна	0,03-1,0	87,1±1,27
V дослідна	0,03-1,2	86,5±1,22
VI дослідна	0,03-1,4	86,6±1,18
VII дослідна	0,03-1,6	86,0±2,33
VIII дослідна	0,03-1,8	85,9±2,58
IX дослідна	0,03-2,0	85,7±2,98

Виявлено вплив величини подрібнення на показники елімінації ензимів із сичугів. За використання подрібнених сичугів із величиною часток 0,03-0,4 мм вміст загального білка у екстракті становив 89,5 мг/дм³. За наявності часток 0,6 мм вміст загального білка у екстракті збільшується на 0,3 %, різниця із I-ю дослідною групою не мала статистичної значущості. У III- та IV-й дослідних групах вміст загального білка знизився, відповідно, на 1,3 та 2,65 % відносно I-ї

дослідної групи. За наявності у подрібненій біомасі сичугів часток із величиною 1,2-1,6 мм вміст загального білка знижується на 3,3-3,9 % відносно I-ї дослідної групи. У VIII- дослідній групі вміст загального білка у екстракті був нижчим ніж у VII-й дослідній групі на 0,11 %. Найменший вміст загального білка був у варіанті із найбільшою величиною часток.

Встановлено, що оптимальний розмір часток сичуга для екстракції становив 0,03-0,6 мм оскільки показники вмісту загальних білків для цієї групи проб були найвищими відносно результатів даних інших груп. Підвищення розмірів часток сичугів призводить до тенденції зниження екстракції із них ензимів, що пов'язано зі зменшенням дії екстрагента на біоматеріал.

Важливим завданням було визначення оптимального часу екстракції ензимів у зв'язку з тим, що у літературі не зустрічаються випадки використання екстрагентів, в яких поєднували органічні і неорганічні кислоти, і як на це впливав час екстракції. Для постановки дослідів було сформовано 9 дослідних груп (n=4) (табл. 3.7.).

Встановлення оптимального часу екстракції ензимів

Таблиця 3.7.

Група проб	Час екстракції, год	Вміст загальних білків, мг/дм ³
I дослідна	6,0	63,3±0,88
II дослідна	8,0	69,4±0,97*
III дослідна	10,0	77,6±1,03**
IV дослідна	12,0	89,4±0,77***
V дослідна	14,0	89,3±1,58***
VI дослідна	16,0	89,1±1,98***
VII дослідна	18,0	88,9±0,88***
VIII дослідна	20,0	89,2±1,38***
IX дослідна	22,0	88,7±1,77***

Примітка: * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$ відносно I дослідної групи.

За проведення екстракції продовж 6,0 годин вміст загального білка у екстракті був на рівні 63,3 мг/дм³. За підвищення часу екстракції на 2,0 години (II-га дослідна група) вміст загального білка збільшується на статистично

значущу величину. Різниця між групами становила 9,6 %. За екстракції протягом 10,0 годин вміст загального білка у розчині збільшується на 22,5 % відносно I-ї дослідної групи. Різниця була статистично значущою. За культивування подрібнених сичугів у розчині кислот протягом 12,0 годин екстрагент містив найбільший вміст сичужних ензимів за показником загального білка відносно I-, II- та III-ї дослідних груп. За підвищення часу культивування від 14,0 до 22,0 годин вміст білка у екстракті був статистично більшим відносно I-ї дослідної групи, проте відносно IV-ї дослідної групи (12,0 годин екстракції) збільшення показника не було зафіксовано.

3.1.4. Встановлення оптимального гідромодуля

З огляду на те, що для іммобілізації екстрагованих сичужних ензимів на органічних носіях і для подальшого їх висушування об'єм розчину останніх має бути найменший, вивчали оптимальне співвідношення маси джерела ензимів (гомогенат сичугів) до об'єму екстрагента (табл. 3.8.).

Для контролю гомогенат сичугів екстрагували застосовуючи 10 см³ дистильованої кислоти із оптимальною концентрацією соляної та молочної кислот. У контрольному варіанті вміст екстрагованих білків без фільтрування, до складу яких входять сичужні ензими, становив 90,12 мг/дм³. У I-й дослідній групі проб співвідношення маси джерела ензимів до об'єму екстрагента знизили на 10,0 % відносно контролю, проте кількість екстрагованих білків не зменшилась.

Показники екстракції розчинних білків зокрема ензимів, із гомогенату сичугів, n = 4

Таблиця 3.8.

Група проб	Співвідношення маси тканини (гомогенат сичугів) до об'єму екстрагента	Уміст білків у екстрагенті, мг/дм ³
Контрольна	1 : 55,25	90,12±1,324
I дослідна	1 : 49,72	90,23±0,976
II дослідна	1 : 44,20	90,14±1,676

Продовження таблиці 3.8

III дослідна	1 : 38,67	90,13±0,867
IV дослідна	1 : 33,15	90,14±0,768
V дослідна	1 : 27,62	90,11±1,274
VI дослідна	1 : 22,10	90,05±0,546
VII дослідна	1 : 16,57	90,00±0,574
VIII дослідна	1 : 11,05	85,65±0,673
IX дослідна	1 : 5,52	70,23±0,637**
X дослідна	1 : 2,76	45,30±0,352***

Примітка ** - $p < 0,01$; ***- $p < 0,001$.

Застосовуючи співвідношення 1 до 44,20 (II-га дослідна група) не спостерігали зменшення показника екстракції ензимів із гомогенату сичугів. Зниження кількості екстрагента, відповідно, на 30,0; 40,0; 50,0 та 60,0 % відносно показника у контролі (III-VI-та дослідні групи) не супроводжувалось статистично значущим зменшенням показника екстракції білків із гомогенату сичугів, зокрем ензимів.

Найменшим співвідношенням, за якого не виявлено статистично значущого зниження показника екстракції ензимів із біоматеріалу було 1:16,57. Показник екстракції був меншим ніж у контролі на 0,13 %. Різниця не перевищувала показника похибки.

За зменшення об'єму екстрагента на 80,0 % від контролю показник екстракції білків знижується на 4,96 %. Різниця мала прояв тенденції. На статистично значущу величину зменшився показник екстракції ензимів із гомогенату сичугів за співвідношення 1:5,52. Різниця із контролем становила 22,1 %. Найменший показник екстракції ензимів із гомогенату сичугів було виявлено за співвідношення 1:2,76 (X-та дослідна група проб). Одержані дані були меншими відносно контрольної групи на 49,7 % ($p < 0,001$).

Отже, доведено, що оптимально мінімальним співвідношенням гомогенату сичугів до розчину мінерально-органічних кислот є 1 (маса) до 16,57 (об'єм). Зменшення об'єму екстрагента нижче цього показника

призводить до статистично значущого зниження вилучення білків із гомогенату сичугів.

3.1.5. Дослідження активності іммобілізованих сичужних ензимів

Під час іммобілізації сичужних ензимів використовували екстракт, отриманий за співвідношення 1 (маса подрібнених сичугів) до 16,57 (об'єм кислот) у дозах від 1,0 до 10,0 см³, до яких вносили по 1000,0 мг сухої сироватки, 0,25 см³ 1,0 М CaCl₂ (перша серія досліду). У другій серії досліду об'єми екстрактів сичужних ензимів та об'єм 1,0 М CaCl₂ залишали аналогічними, що і у першій серії, а як носій використовували сухе молоко.

Стабілізацію проводили фізичним методом адсорбції за допомогою постійного перемішування розчинів ензимів із носіями за наявності спейсера.

Ефективність іммобілізації ензимів перевіряли через сквашування молока корів, визначаючи час початку цього процесу. Використовуючи іммобілізовані сичужні ензими, які знаходились у 1,0 см³ на 1000 мг сухої сироватки було встановлено, що продовж 60 хвилин сквашування молока не відбувалось. За таких умов сквашування молока розпочалось лише на 86 хвилину після внесення ензимів (табл. 3.9).

Ефективність сквашування молока стабілізованими на сухій сироватці сичужними ензимами, $M \pm m$, $n=4$

Таблиця 3.9.

Об'єм екстракту сичужних ензимів, см ³	Початок сквашування молока, хв	Якість молочного згустку на 60 хвилину сквашування
1,0	86,0 \pm 0,28	Молочний згусток відсутній
2,0	75,0 \pm 0,41***	Молочний згусток відсутній
3,0	54,0 \pm 0,34***	Молочний згусток не сформований
4,0	51,0 \pm 0,50***	Молочний згусток не сформований
5,0	49,0 \pm 0,30***	Молочний згусток не сформований
6,0	45,0 \pm 0,40***	Молочний згусток не щільний

Продовження таблиці 3.9

7,0	39,0±0,50***	Молочний згусток не щільний
8,0	25,0±0,30***	Щільний, добре ріжеться
9,0	22,0±0,50***	Щільний, добре ріжеться
10,0	22,0±0,45***	Щільний, добре ріжеться

Примітка:*** – ($p < 0,001$) відносно варіанта, де використовували сичужні ензими іммобілізовані із 1,0 см³ екстракту.

За сквашування молока сичужними ензимами, стабілізованих із 2,0 см³ екстракту, не було встановлено утворення молочного згустку на 60 хвилину сквашування. Проте час утворення молочного згустку скоротився на 11,0 хвилин відносно варіанта де використовували сичужні ензими іммобілізовані із 1,0 см³ екстракту.

За 60 хвилин сквашування молока стабілізованими ензимами із 3,0; 4,0 та 5,0 см³ екстракту не було виявлено сформованого молочного згустку. Час утворення згустку скоротився на статистично значущу величину відносно варіанта де використовували сичужні ензими іммобілізовані із 1,0 см³ екстракту.

Використання ензимів із проб, отриманих методом їх стабілізації із екстракту із об'ємом 6,0 та 7,0 см³ призводить до зменшення часу початку сквашування на 47,6 % та у 2,2 рази відносно варіанта де на 1000 мг сухої сироватки іммобілізували сичужні ензими із 1,0 см³ екстракту. На 60 хвилину ферментації було виявлено не щільний молочний згусток.

Встановлено, що найшвидше формувався молочний згусток за сквашування стабілізованими ензимами, де об'єм екстракту становив 9,0 та 10,0 см³. У цих варіантах на 60 хвилину ферментації молочний згусток був щільним і відповідав чинним вимогам.

Також було проведено дослідження щодо встановлення ефективності сквашування молока сичужними ензимами, іммобілізованими на сухому молоці. За ферментації молока стабілізованими ензимами, отриманими під час

використання 1,0 см³ екстракту сичугів на 60 хвилину експерименту не було виявлено утворення молочного згустку. Ознаки початку сквашування молока в цьому варіанті зафіксовані на 92,0 хвилину сквашування (табл. 3.10).

Ефективність сквашування молока стабілізованими на сухому молоці сичужними ензимами, $M \pm m$, $n=4$ *Таблиця 3.10.*

Об'єм екстракту сичужних ензимів, см ³	Початок сквашування молока, хв	Якість молочного згустку на 60 хвилину сквашування
1,0	92,0±0,35	Молочний згусток відсутній
2,0	88,0±0,50*	Молочний згусток відсутній
3,0	63,0±0,45***	Молочний згусток не сформований
4,0	57,0±0,50***	Молочний згусток не сформований
5,0	51,0±0,25***	Молочний згусток не сформований
6,0	49,0±0,45***	Молочний згусток не сформований
7,0	42,0±0,65***	Молочний згусток не шільний
8,0	36,0±0,40***	Молочний згусток не шільний
9,0	31,0±0,35***	Щільний, добре ріжеться
10,0	28,0±0,55***	Щільний, добре ріжеться

Примітка: * ($p < 0,05$); *** – ($p < 0,001$) відносно варіанта, де використовували сичужні ензими іммобілізовані із 1,0 см³ екстракту.

Застосування сичужних ензимів (стабілізація ензимів із 2 см³ екстракту на 1000 мг сухого молока) призводить до скорочення часу утворення згустку на 4,0 хвилини відносно варіанта де використовували сичужні ензими іммобілізовані із 1,0 см³ екстракту. Різниця мала статистичну значущість. На 60 хвилину сквашування у цьому варіанті утворення молочного згустку не було виявлено.

За використання препаратів, де ензими іммобілізували із 3,0-6,0 см³ екстракту, на статистично значущу величину скорочується час утворення

молочного згустку у порівнянні із сичужними ензимами іммобілізованими із 1,0 см³ екстракту. Ферментація продовж 60 хвилин не дала можливості отримати сформований молочний згусток.

Препарати, для виготовлення яких було задіяно 7,0 та 8,0 см³ екстракту сичугів, сприяють пришвидшенню утворення молочного згустку, відповідно, на 7,0 та 13,0 хвилин у порівнянні із сичужними ензимами, іммобілізованими із 6,0 см³ екстракту. За 60-хвилинної ферментації було отримано нещільний молочний згусток.

За використання ензимів, стабілізованих із 10,0 см³ екстракту сквашування молока розпочиналось найшвидше. Молочний згусток був у міру щільний і добре різався.

Порівнюючи ефективність використання сичужних ензимів стабілізованих на сухій молочній сироватці та сухому молоці було встановлено, що за додавання ензимів стабілізованих на сухій сироватці утворення молочного згустку розпочалось на 6,0 хвилин раніше ніж за варіанта з використанням ензимів, стабілізованих на сухому молоці.

Досліджуючи період придатності сичужних ензимів, іммобілізованих на сухій сироватці було встановлено, що за внесення у молоко препаратів після 3-х місячного зберігання утворився задовільний молочний згусток. Аналогічне згортання молока було отримано і за використання нативних сичужних ензимів, які зберігали у холодильнику продовж 3 місяців (табл. 3.11.).

Встановлення активності ензимів стабілізованих на сухій сироватці, які зберігали за температури 2,0–4,0 °C *Таблиця 3.11.*

Час зберігання ензимів	Характеристика молочного згустку за 60 хвилин сквашування	
	За використання стабілізованих ензимів	За використання нативних ензимів
3 місяці зберігання	Молочний згусток щільний, добре ріжеться	Молочний згусток щільний, добре ріжеться
6 місяців зберігання	Молочний згусток щільний, добре ріжеться	Молочний згусток щільний, добре ріжеться

Продовження таблиці 3.11

9 місяців зберігання	Молочний згусток щільний, добре ріжеться	Молочний згусток щільний, добре ріжеться
12 місяців зберігання	Молочний згусток щільний, добре ріжеться	Молочний згусток щільний, добре ріжеться
15 місяців зберігання	Молочний згусток щільний, добре ріжеться	Молочний згусток щільний, добре ріжеться
18 місяців зберігання	Молочний згусток щільний, добре ріжеться	Молочний згусток щільний, добре ріжеться
21 місяць зберігання	Молочний згусток щільний, добре ріжеться	Молочний згусток щільний, добре ріжеться
24 місяці зберігання	Молочний згусток щільний, добре ріжеться	Молочний згусток щільний, добре ріжеться
27 місяців зберігання	Молочний згусток щільний, добре ріжеться	Молочний згусток щільний, добре ріжеться
30 місяців зберігання	Молочний згусток щільний, добре ріжеться	Молочний згусток не щільний
33 місяці зберігання	Молочний згусток щільний, добре ріжеться	Молочний згусток не щільний
36 місяців зберігання	Молочний згусток щільний, добре ріжеться	Молочний згусток не сформований

Аналогічне згортання молока було одержано за використання іммобілізованих та нативних ензимів, які зберігали продовж 6-ти місяців. За внесення у молоко стабілізованих і нативних сичужних ензимів, які зберігали 9 місяців, було отримано якісний згусток за одну годину. Застосування річних стабілізованих сичужних ензимів дозволяє отримати щільний молочний згусток.

Встановлено позитивне сквашування молока за внесення у нього нативних та іммобілізованих сичужних ензимів, які зберігали 15-18 місяців у охолодженому стані. Аналогічні характеристики молочних згустків було виявлено за сквашування молока сичужними ензимами, які зберігали 21-24 місяці.

На 30-му місяці експерименту було виявлено, що за використання іммобілізованих ензимів утворюється задовільний молочний згусток. Водночас використання нативного ензиму не дало змоги протягом 60 хвилин ферментування отримати щільний згусток молока. Аналогічні результати досліджень були отримані за використання іммобілізованих і нативних ензимів, які зберігали протягом 33 місяців.

Наприкінці експерименту було виявлено, що за внесення іммобілізованих ензимів молочний згусток за 60 хвилин формується щільний. Застосування нативних ензимів не дало можливості отримати сформованого згустку.

Також були проведені дослідження щодо вивчення активності сичужних ензимів за їх збереження за кімнатної температури. За внесення у молоко нативних та іммобілізованих ензимів після 3-х місячного зберігання вдалося отримати задовільний молочний згусток, придатний для виготовлення сиру (табл. 3.12.).

Сквашування молока після 6-ти місяців зберігання від початку експерименту різними формами сичужних ензимів дало можливість отримати сиропридатний молочний згусток.

Встановлення активності ензимів, стабілізованих на сухій сироватці, які зберігали за температури 17,0–21,0 °C *Таблиця 3.12.*

Час зберігання ензимів	Характеристика молочного згустку за 60 хвилин сквашування	
	За використання стабілізованих ензимів	За використання нативних ензимів
3 місяці зберігання	Молочний згусток щільний, добре ріжеться	Молочний згусток щільний, добре ріжеться
6 місяців зберігання	Молочний згусток щільний, добре ріжеться	Молочний згусток щільний, добре ріжеться
9 місяців зберігання	Молочний згусток щільний, добре ріжеться	Молочний згусток щільний, добре ріжеться
12 місяців зберігання	Молочний згусток щільний, добре ріжеться	Молочний згусток щільний, добре ріжеться

Продовження таблиці 3.12

15 місяців зберігання	Молочний згусток щільний, добре ріжеться	Молочний згусток щільний, добре ріжеться
18 місяців зберігання	Молочний згусток щільний, добре ріжеться	Молочний згусток щільний, добре ріжеться
21 місяць зберігання	Молочний згусток щільний, добре ріжеться	Молочний згусток щільний, добре ріжеться
24 місяці зберігання	Молочний згусток щільний, добре ріжеться	Молочний згусток не щільний
27 місяців зберігання	Молочний згусток щільний, добре ріжеться	Молочний згусток не щільний
30 місяців зберігання	Молочний згусток щільний, добре ріжеться	Молочний згусток не сформований
33 місяці зберігання	Молочний згусток щільний, добре ріжеться	Молочний згусток не сформований
36 місяців зберігання	Молочний згусток не щільний	Утворені поодинокі тяжі

За використання іммобілізованих сичужних ензимів, які зберігали від 9 до 21-го місяця, вдалося отримати щільний молочний згусток, який добре ріжеться. Аналогічні результати були отримані за внесення у молоко нативних сичужних ензимів.

Використання іммобілізованих на сухій сироватці сичужних ензимів після двох років зберігання за кімнатної температури не мало негативного впливу на їх активність, що підтверджується якістю утвореного молочного згустку. Водночас продовж 60- хвилинної ферментації молока із додаванням нативних сичужних ензимів телят не вдалося отримати якісного молочного згустку.

За сквашування молока нативними ензимами, які зберігали продовж 24 та 27 місяців молочний згусток був нещільний. Додавання іммобілізованих сичужних ензимів, які теж зберігали 24 та 27 місяців дало можливість отримати задовільний молочний згусток.

Не встановлено ефективного сквашування молока продовж 60 хвилин ферментації нативними сичужними ензимами, які зберігали продовж 30-33 місяців. Молочний згусток був несформований. Додавання іммобілізованих сичужних ензимів аналогічного часу зберігання дало можливість отримати щільні молочні згустки.

Трихрічне зберігання нативних сичужних ензимів за кімнатної температури не дає можливості продовж 60 хвилин сквашувати молоко. За обліковий період було виявлено у молоці поодинокі тяжі. Внесення іммобілізованих сичужних ензимів після 36 місяців зберігання дозволяє отримати молочний згусток, але із незадовільною щільністю.

Проводили вивчення збереження активності сичужних ензимів, іммобілізованих на сухому молоці. Сквашування молока як нативними так і іммобілізованими ензимами після 90 діб зберігання дозволило отримати щільний молочний згусток (табл. 3.13).

Внесення у молоко нативних та іммобілізованих сичужних ензимів, які зберігали продовж року, привело до формування задовільного щільного молочного згустку.

Встановлення активності ензимів, стабілізованих на сухому молоці, які зберігали за температури 2,0–4,0 °С *Таблиця 3.13.*

Час зберігання ензимів	Характеристика молочного згустку за 60 хвилин сквашування	
	За використання стабілізованих ензимів	За використання нативних ензимів
3 місяці зберігання	Молочний згусток щільний, добре ріжеться	Молочний згусток щільний, добре ріжеться
6 місяців зберігання	Молочний згусток щільний, добре ріжеться	Молочний згусток щільний, добре ріжеться
9 місяців зберігання	Молочний згусток щільний, добре ріжеться	Молочний згусток щільний, добре ріжеться
12 місяців зберігання	Молочний згусток щільний, добре ріжеться	Молочний згусток щільний, добре ріжеться

Продовження таблиці 3.13

15 місяців зберігання	Молочний згусток щільний, добре ріжеться	Молочний згусток щільний, добре ріжеться
18 місяців зберігання	Молочний згусток щільний, добре ріжеться	Молочний згусток щільний, добре ріжеться
21 місяць зберігання	Молочний згусток щільний, добре ріжеться	Молочний згусток щільний, добре ріжеться
24 місяці зберігання	Молочний згусток щільний, добре ріжеться	Молочний згусток щільний, добре ріжеться
27 місяців зберігання	Молочний згусток щільний, добре ріжеться	Молочний згусток щільний, добре ріжеться
30 місяців зберігання	Молочний згусток щільний, добре ріжеться	Молочний згусток не щільний
33 місяці зберігання	Молочний згусток не щільний, добре ріжеться	Молочний згусток не щільний
36 місяців зберігання	Молочний згусток не щільний	Молочний згусток не сформований

Було встановлено чітке згортання молока продовж 60 хвилин ферментації за додавання до нього іммобілізованих і нативних сичужних ензимів, які зберігали у холодильнику протягом 15-21 місяця. Аналогічне згортання молока було зафіксоване за використання нативних і іммобілізованих сичужних ензимів після 27 місяців зберігання.

Додавання до молока іммобілізованих сичужних ензимів після 30 місяців зберігання дало можливість до години часу отримати молочний згусток, який відповідає технології виготовлення сиру. За внесення нативних ензимів 30-місячного зберігання не вдалось продовж 60 хвилин отримати щільний молочний згусток, що вказує на зниження ферментативної активності. Застосовуючи як нативні так і іммобілізовані сичужні ензими, що зберігали 33 місяці, продовж години було одержано молочні згустки, які за характеристикою були аналогічними, що і у варіанті де до молока додавали ензими 30-місячного зберігання.

Застосовуючи іммобілізовані сичужні ензими після трьох років зберігання вдалось отримали лише нещільний молочний згусток продовж 60 хвилинної ферментації молока, що може пояснюватись значною частиною молочних жирів у матриці, які з часом окислялись і прискорювали зниження активності ензимів. За додавання до молока нативних сичужних ензимів, які зберігали 36 місяців, не вдалось отримати молочного згустку.

Досліджуючи вплив часу зберігання нативних та іммобілізованих сичужних ензимів за кімнатної температури на їх активність було встановлено ряд закономірностей. За додавання до молока корів обох форм сичужних ензимів, які зберігали 3 місяці, вдалось отримати задовільні молочні згустки (табл. 3.14).

Встановлення активності ензимів стабілізованих на сухому молоці, які зберігали за температури 17,0–21,0 °C

Таблиця 3.14.

Час зберігання ензимів	Характеристика молочного згустку за 60 хвилин сквашування	
	За використання стабілізованих ензимів	За використання нативних ензимів
3 місяці зберігання	Молочний згусток щільний, добре ріжеться	Молочний згусток щільний, добре ріжеться
6 місяців зберігання	Молочний згусток щільний, добре ріжеться	Молочний згусток щільний, добре ріжеться
9 місяців зберігання	Молочний згусток щільний, добре ріжеться	Молочний згусток щільний, добре ріжеться
12 місяців зберігання	Молочний згусток щільний, добре ріжеться	Молочний згусток щільний, добре ріжеться
15 місяців зберігання	Молочний згусток щільний, добре ріжеться	Молочний згусток щільний, добре ріжеться
18 місяців зберігання	Молочний згусток щільний, добре ріжеться	Молочний згусток щільний, добре ріжеться
21 місяць зберігання	Молочний згусток щільний, добре ріжеться	Молочний згусток щільний, добре ріжеться
24 місяці зберігання	Молочний згусток щільний, добре ріжеться	Молочний згусток не щільний

Продовження таблиці 3.14

27 місяців зберігання	Молочний згусток щільний, добре ріжеться	Молочний згусток не щільний
30 місяців зберігання	Молочний згусток не щільний	Молочний згусток не сформований
33 місяці зберігання	Молочний згусток не щільний	Молочний згусток не сформований
36 місяців зберігання	Молочний згусток не сформований	Утворені поодинокі тяжі

Задовільні молочні згустки на 60 хвилину ферментації було одержано за внесення у молоко іммобілізованих та нативних сичужних ензимів після 6-12 місяців зберігання.

За наявності у молоці іммобілізованих сичужних ензимів після 15-місячного зберігання згортання молока відбулось до години. Молочний згусток мав задовільну характеристику. Аналогічні результати дослідження були отримані за використання нативних сичужних ензимів.

Застосування нативних та іммобілізованих сичужних ензимів після 18 та 21 місяця зберігання дозволило отримати щільний молочний згусток, який піддається механічній обробці.

За додавання до молока нативних ензимів після 24 місяців зберігання не вдалось за 60 хвилин отримати ефективного молочного згустку. Використання іммобілізованих ензимів дозволило отримати якісний молочний згусток. Аналогічні дані були отримані за використання нативних та іммобілізованих ензимів після 27 місяців зберігання за кімнатної температури.

За дії іммобілізованих сичужних ензимів після 30-33 місяців зберігання 60-хвилинна ферментація дозволила отримати нещільний молочний згусток. За внесення нативних ензимів молочний згусток продовж години був несформований. Додавання у молоко іммобілізованих сичужних ензимів, які зберігали три роки, не забезпечило ефективного згортання молока. Молочний згусток був несформований. Ферментування молока із нативними сичужними

ензимами не приводило до згортання молока. На 60 хвилину дослідження молоко містило поодинокі тяжі.

Отже, доведено, що іммобілізовані сичужні ензими на сухому молоці за температури 2,0–4,0 та 17,0–21,0 °С зберігають свою активність протягом 33 та 27 місяців. Порівнюючи іммобілізовані ензими на сухій сироватці та сухому молоці було доведено, що ензими стабілізовані на сухій сироватці здатні довше зберігати свою активність на 3 місяці за кімнатної температури у порівнянні із ензимами стабілізованими на сухому молоці.

Результати цих досліджень відображені у наукових працях [2, 5].

3.2. Встановлення нешкідливості та гострої токсичності стабілізованих сичужних ензимів

Під час встановлення нешкідливості стабілізованих сичужних ензимів виявлено, що за десятидобового експерименту летальних випадків мишей не фіксували.

Доведено, що протягом 1,5-2,0 годин після введення розчину ензимів (0,25 см³ 15,0 %) та фізіологічного розчину (І-ша дослідна і контрольна групи) не відмічали етологічних змін у мишей. Тварини проявляли позитивну реакцію на зовнішні подразники.

У 4 лабораторних тварин, яким вводили по 0,25 см³ 30,0 % розчину стабілізованих сичужних ензимів (ІІ-га дослідна група) продовж перших 2,5 годин від початку експерименту було встановлено незначну пригніченість. Тварини загальмовано реагували на зовнішні подразники і менше рухались у порівнянні із контрольними мишами. З часом тварини відновлювали рухливість та адекватно і швидко реагували на світлові подразники, шум та дотики. У 20,0 % лабораторних тварин (одна голова) впродовж перших 10-15 годин відмічали розлади шлунково-кишкового тракту. Наприкінці першої доби експерименту споживання тваринами корму та води повністю відновилось. Миші періодично підходили до комбікорму та поїлок.

Після першої доби і до закінчення експерименту поведінка білих мишей як у контрольній так і дослідних групах відповідала фізіологічним нормам.

За проведення розтину тушок мишей та виконання патолого-анатомічних досліджень доведено, що стан внутрішніх органів тварин із дослідних груп не відрізнявся від стану внутрішніх органів мишей із контрольної групи.

Із відібраних проб печінки мишей виготовляли гомогенат і у ньому визначали ряд біохімічних показників.

Вивчаючи деякі показник білкового обміну у печінці білих мишей за встановлення нешкідливості стабілізованих сичужних ензимів виявлено, що активність аланінамінотрансфери у лабораторних тварин із I-ї дослідної групи була більшою ніж у контролі на 2,5 %. Різниця була в межах похибки (табл. 3.15).

Активність аланінамінотрансфери у гомогенаті печінки мишей із II-ї дослідної групи була більшою ніж у контрольних тварин. Різниця не мала статистичної значущості.

Досліджуючи активність аспартатамінотрансфери у печінці мишей із II-ї дослідної групи виявлено, що різниця із контролем становила в межах 4,0 %. Показник був в межах похибки. Не виявлено статистичного збільшення активності аспартатамінотрансфери у печінці мишей із I-ї дослідної групи відносно мишей із контрольної групи.

Деякі показники білкового обміну в печінці лабораторних тварин за дії стабілізованих ензимів, $M \pm m$, $n=5$

Таблиця 3.15.

Група	Активність аланінамінотрансфери, мкмоль/год/г	Активність аспартатамінотрансфери, мкмоль/год/г	Вміст білка, г/кг
Контрольна	11,7 \pm 0,58	9,8 \pm 0,53	40,1 \pm 1,32
I дослідна	12,0 \pm 0,91	10,0 \pm 0,38	42,0 \pm 2,06
II дослідна	12,1 \pm 0,55	10,2 \pm 0,51	41,5 \pm 2,11

Уміст загального білка у печінці мишей із контрольної групи становив 40,1 г/кг. Найвищий вміст білка у гомогенаті печінки лабораторних тварин було

виявлено у I-й дослідній групі. Різниця із контролем становила 4,7 % і не мала статистичної значущості. Одноразове введення мишам 0,25 см³ 30,0 % розчину стабілізованих сичужних ензимів не призводить до статистично значущого збільшення вмісту загального білка у печінці тварин II-ї дослідної групи у порівнянні із тваринами із контрольної групи.

Введення мишам 0,25 см³ 15,0 та 30,0 % розчину стабілізованих сичужних ензимів не призводить до статистично значущого підвищення показників білкового обміну у печінці мишей. Активність амінотрансфераз і вміст загального білка у печінці лабораторних тварин не мали розбіжності із фізіологічними нормами.

Вивчаючи вміст гемоглобіну у крові білих мишей виявлено, що введення 15,0 % розчину стабілізованих ензимів не призводило до статистично значущого підвищення цього показника відносно контролю. У крові лабораторних мишей із II-ї дослідної групи встановлено менший вміст гемоглобіну у порівнянні із тваринами з контрольної групи. Різниця становила 1,3 % і не мала статистичної значущості (табл. 3.16).

Біохімічні показники у крові мишей, $M \pm m$, $n=5$

Таблиця 3.16

Група	Вміст глюкози, ммоль/л	Вміст гемоглобіну, г/л
Контрольна	4,3 \pm 0,34	138,2 \pm 4,18
I дослідна	4,5 \pm 0,27	140,4 \pm 3,77
II дослідна	4,9 \pm 0,19	136,4 \pm 3,81

У крові тварин із I-ї дослідної групи вміст глюкози був вищим на 4,6 % відносно лабораторних тварин із контрольної групи. Різниця не перевищувала значень похибки. Виявлено підвищення вмісту глюкози у крові мишей, яким вводили 30,0 % розчин стабілізованих ензимів. Різниця мала прояв тенденції. Підвищення вмісту глюкози у крові мишей із дослідних груп було в межах фізіологічної норми.

Одним із показників у організмі біооб'єкта, за яким можна судити про вміст токсичних речовин у кормових чи харчових добавках, є вміст сульфогідрильних груп. За надходження речовин, які містять токсичні сполуки, концентрація тіолових груп може зменшуватись у тканинах і органах. Доведено, що у печінці мишей із контрольної групи вміст загальних сульфогідрильних груп був у межах 870,5 мкг/г (табл. 3.17).

Сульфогідрильні групи у печінці мишей, мкг/г $M \pm m$, $n=5$

Таблиця 3.17.

Група	Загальні	Білкові	Вільні
Контрольна	870,5 \pm 7,33	816,4 \pm 6,34	54,1 \pm 1,95
I дослідна	880,2 \pm 6,43	822,4 \pm 5,34	57,8 \pm 2,77
II дослідна	875,4 \pm 6,87	823,3 \pm 5,88	52,1 \pm 2,81

За введення лабораторним тваринам 0,25 см³ 15,0 % розчину стабілізованих сичужних ензимів вміст загальних HS-груп у їх печінці був більшим на 1,1 %. Різниця була в межах похибки. У II-й дослідній групі вміст загальних тіолових груп у печінці лабораторних тварин був вищим ніж у мишей із контрольної групи на 0,5 %. Різниця не перевищувала значення похибки.

Оцінюючи вміст білкових сульфогідрильних груп у печінці тварин встановлено, що у мишей із I-ї дослідної групи підвищення HS-груп становило 0,7 % відносно контролю. Різниця була в межах похибки. Не встановлено статистично значущого підвищення вмісту білкових тіолових груп у печінці мишей, яким внутрішньошлунково вводили 0,25 см³ 30,0 % розчину стабілізованих ензимів.

У печінці тварин із контрольної групи вміст вільних HS-груп становив 54,2 мкг/г. Введення підвищених доз розчину стабілізованих сичужних ензимів не приводило до статистично значущого збільшення сульфогідрильних груп у печінці лабораторних тварин із I-ї дослідної групи. Зменшення вільних тіолових груп у печінці лабораторних мишей із II-ї дослідної групи відносно контролю було в межах похибки.

Отже, доведено, що одноразове введення мишам 0,25 см³ 15,0 та 30,0 % розчину стабілізованих сичужних ензимів не призводить до статистично значущого зменшення білкових HS-груп, що свідчить про їх нетоксичність.

Враховуючи стан лабораторних тварин, показники патолого-анатомічних, біохімічних досліджень, доведено, що стабілізовані сичужні ензими можна віднести до нешкідливих харчових добавок.

Поряд із вивченням нешкідливості досліджували гостру токсичність стабілізованих сичужних ензимів. Встановлено, що за введення лінійним мишам розчину ензимів, у дозах від 5 до 250 мг/кг маси тіла, продовж періоду спостереження (14 діб) змін їх етологічних показників не було виявлено. Миші адекватно реагували на подразники, постійно переміщувались по клітці, активно споживали корм та воду. Не було виявлено летальних випадків у цих групах (табл. 3.18).

Введення мишам стабілізованих ензимів у дозі 5000 мг/кг призводило до їх пригнічення продовж 2,5-3,0 годин. З часом поведінка лабораторних тварин у цій групі відновлювалась і відповідала фізіологічним нормам.

Результати проведення орієнтованого дослідження щодо визначення гострої токсичності стабілізованих сичужних ензимів на білих мишах

Таблиця 3.18.

Кількість тварин у групі	Доза стабілізованих ензимів, мг/кг	Кількість тварин, які загинули		
		всього	у %	час загибелі
4	5	0	0	0
4	250	0	0	0
4	5000	0	0	0

Під час виконання розгорнутого дослідження не було виявлено відхилень в поведінці лабораторних тварин, яким вводили по 2000 та 3000 мг/кг маси тіла стабілізованого ферменту. За внутрішньошлункового введення дози біомаси

ферментів (4000 мг/кг маси тіла) у 2 тварин із групи було виявлено тимчасове загальмування рухів (1,5–2,5 години), миші в цей період не споживали комбікорму. На 4-ту годину експерименту у тварин із цієї групи рухова активність відновились, вони почали поступове споживання корму (табл. 3.19).

Під час вивчення дози стабілізованих сичужних ензимів 5000 мг/кг у однієї миші виявлено розлади функцій шлунково-кишкового тракту. Рухи тварин із цієї групи були сповільнені продовж 3-4 годин. Через 6-7 годин після введення ферментів споживання корму та води у тварин повністю відновлювалось. На 36 годину дослідження функціонування шлунково-кишкового тракту у тварини було у нормі.

Етологічні зміни у тварин, яким вводили стабілізовані ензими у кількості 4000 та 5000 мг/кг появляються введенням мишам великої дози препарату.

Доведено, що за розгорнутого досліду під час введення мишам стабілізованих сичужних ензимів у дозах від 2000 до 5000 мг/кг маси тіла за період експерименту тривалістю 14 діб не виявлено загибелі мишей.

Результати проведення розгорнутого досліду щодо визначення гострої токсичності стабілізованих сичужних ензимів на білих мишах

Таблиця 3.19.

Кількість тварин у групі	Доза стабілізованих ензимів, мг/кг	Кількість тварин, які загинули		
		всього	у %	час загибелі
4	2000	0	0	0
4	3000	0	0	0
4	4000	0	0	0
5	5000	0	0	0

Доведено, що стабілізовані ензими належать до малотоксичних речовин – 4 клас. DL_{50} стабілізованих сичужних ензимів за внутрішньошлункового введення лінійним мишам є більшою 5000 мг/кг.

Для ширшої токсикологічної оцінки стабілізованих сичужних ензимів визначення гострої токсичності проводили повторно на лінійних щурах. Дози ензимів із розрахунку на кілограм маси тіла були аналогічними, як і для білих мишей.

Під час орієнтованого дослідження за введення (внутрішньошлунково) лінійним щурам стабілізованих ензимів (від 5 до 250 мг/кг маси тіла) не було встановлено відхилень у їх поведінці продовж 14 діб спостережень. Тварини адекватно реагували на світло, шум та дотики, постійно рухались по клітці та споживали комбікорм і пили воду. За введення дози стабілізованих ензимів 250 мг/кг маси тіла загибелі щурів не було виявлено (табл. 3.20.).

Доза стабілізованих ензимів 5000 мг/кг у білих щурів зумовлювала короточасну пригніченість, що на 2,0-3,5 години вплинуло на їх рухову активність та споживання комбікорму. У одного щура відмічали розлад функції шлунково-кишкового тракту. За 12-14 годин від початку експерименту поведінка тварин відповідала фізіологічним нормам.

Результати проведення орієнтованого дослідження щодо визначення гострої токсичності стабілізованих сичужних ензимів на білих щурах

Таблиця 3.20.

Кількість тварин у групі	Доза стабілізованих ензимів, мг/кг	Кількість тварин, що загинули		
		всього	у %	час загибелі
4	5	0	0	0
4	250	0	0	0
4	5000	0	0	0

За введення підвищених доз стабілізованих ензимів (розгорнутий дослід) було встановлено ряд закономірностей у поведінці лабораторних тварин продовж експерименту.

Щурі, яким вводили стабілізовані ензими у дозі 2000–3000 мг/кг маси тіла не мали порушень у поведінці як у перші години так і продовж усього експерименту. У цих тварин активне споживання корму було зафіксовано через 1,5 години після введення їм досліджуваного препарату.

Введення тваринам стабілізованих ензимів у дозі 5000 мг/кг маси тіла спричинило загальмування рухів. Протягом перших годин щурі не споживали корму. У декількох тварин було виявлено розлад функції шлунково-кишкового тракту (табл. 3.21).

Активне споживання комбікорму і води проявлялось на 13–17 годину від початку експерименту. Після 24 годин досліджень робота шлунково-кишкового тракту тварин була в нормі. Етологічні зміни у щурів, яким вводили стабілізовані ензими у кількості 5000 мг/кг можливо пояснити дискомфортом, спричиненим великою дозою ензимів, які мають протеолітичну активність.

За проведення розгорнутого досліді під час введення білим щурам стабілізованих ензимів у дозах від 2000 до 5000 мг/кг маси тіла летальних випадків зафіксовано не було.

Результати проведення розгорнутого досліді щодо визначення гострої токсичності стабілізованих сичужних ензимів на білих щурах

Таблиця 3.21.

Кількість тварин у групі	Доза стабілізованих ензимів, мг/кг	Кількість тварин, які загинули		
		всього	у %	час загибелі
4	2000	0	0	0
4	3000	0	0	0
4	4000	0	0	0
4	5000	0	0	0

Отже, повторно доведено, що препарат стабілізованих сичужних ензимів належить до малотоксичних речовин – 4 клас. DL_{50} стабілізованих ензимів за внутрішньошлункового введення білим щурам є більшою 5000 мг/кг.

3.3. Дослідження технології бринзи за використання іммобілізованих ензимів

3.3.1. Вплив іммобілізованих сичужних ензимів на вихід бринзи та її органолептичні показники

Для дослідження максимально ефективної технології було вирішено

вивчити та порівняти різні форми закваски. Для виготовлення бринзи використовували коров'яче молоко. Перед постановкою експерименту проводили визначення хімічного складу молока.

Експериментально доведено, що хімічний склад коров'ячого молока (табл. 3.22.), яке було відібране для проведення досліджень суттєво не відрізнявся від середньостатистичних показників молока із якого виготовляють сири. Масова частка білка відповідала чинному нормативному документу. Вміст молочного цукру у молоці не перевищував вимог стандарту ДСТУ 3662:2018 [19].

Показники хімічного складу коров'ячого молока, % ($M \pm m$)

Таблиця 3.22.

Показник	Молоко коров'яче
Суша речовина	12,22±0,10
СЗМЗ	8,15±0,08
Масова частка жиру	3,89±0,07
Масова частка білка	3,21±0,05
В т.ч. казеїн	2,17±0,03
Білки сироватки	0,67±0,03
Небілковий нітроген, мг%	28,27±0,22
Лактоза	4,52±0,05
Зола	0,69±0,02

За сухою речовиною, масовою часткою казеїну, золи, сухим знежиреним молочним залишком та вмістом небілкового нітрогену молоко відібране для досліджень відповідало чинним вимогам.

Як у контрольній, так і дослідних групах кожна проба молока становила по 5,0 дм³. Відфільтроване молоко охолоджували до температури 4 °С і витримували 12 годин. Пастеризацію проводили за температури 60–63 °С з витримкою 30 хвилин. Пастеризоване молоко нормалізували за масовою часткою жиру. Ензимні препарати вносили в підігріте до температури 33 °С нормалізоване молоко, плавно перемішуючи його. Згусток різали на кубики

розміром 15–20 мм і залишали у спокої на 10–15 хвилин, потім з метою ущільнення і зневоднення обережно вимішували протягом 20–30 хвилин. Вимішування проводили застосовуючи зупинки на 2–3 хвилини.

Друге нагрівання сирної маси не застосовували. Після достатнього ущільнення сирну масу переміщували на формувальний стіл, покритий марлею в два шари, для самопресування, яке проводили протягом 2 годин. Зберігання зразків здійснювали за температури 4 °С з постійною вентиляцією. Зразки бринзи для сенсорного аналізу відбирали на 20-, 40- та 60- добу зберігання.

Колір, смак, аромат, консистенцію визначали органолептично, використовуючи метод аналізу сиру згідно з ДСТУ 7065:2009.

Доведено, що у контролі, I-й та II-й дослідних групах із одного дм³ молока було одержано відповідно: 120,4±4,12 г, 126,2±3,18 г та 129,7±5,04 г бринзи.

Дослідження свідчать, що за використання стабілізованих сичужних ензимів, одержаних за методикою із застосуванням суміші соляної та молочної кислот (II-га дослідна група) вихід готового продукту збільшується на 7,7 % відносно контролю, де використовували ензими мікробіального походження.

Проведено дослідження органолептичних показників одержаної бринзи за використання різних ензимів. Встановлено, що за показниками бринза із контрольної групи зразків, яку зберігали 20 діб, мала чистий кисломолочний смак без сторонніх запахів. Консистенція однорідна, ламка не крихка. Малюнок, колір сирного тіста та зовнішній вигляд теж відповідали чинним нормативним документам на бринзу (табл. 3.23.).

Досліджуючи бринзу, отриману за використання сичужних ензимів екстрагованих із сичугів молочних телят за методикою із застосуванням розчину хлористого натрію доведено, що смак продукту був чітко вираженим кисломолочним. Не спостерігалось сторонніх запахів сиру за 20- добового зберігання.

Органолептичні показники бринзи на 20-ту добу зберігання*Таблиця 3.23.*

Показник	Характеристика показника
<i>Контрольна група зразків</i>	
Запах та смак	Чистий кисломолочний, без відчуття сторонніх запахів та присмаків
Консистенція	Однорідна, ламка, але не крихка
Колір сирного тіста	Слабо-жовтий, однорідний на всій площі розрізу
Зовнішній вигляд	Поверхня чиста, з відбитками серп'янки. Кірка відсутня. Встановлена незначна деформація головки
<i>I дослідна група зразків</i>	
Запах та смак	Чистий, добре виражений кисломолочний, без відчуття сторонніх запахів та присмаків
Консистенція	Однорідна, ламка, але не крихка
Колір сирного тіста	Слабо-жовтий, однорідний на всій площі розрізу
Зовнішній вигляд	Поверхня чиста, з відбитками серп'янки. Кірка відсутня. Встановлена незначна деформація головки
<i>II дослідна група зразків</i>	
Запах та смак	Чистий кисломолочний, без відчуття сторонніх присмаків і запахів
Консистенція	Однорідна, ламка, але не крихка
Колір сирного тіста	Слабо-жовтий, однорідний на всій площі розрізу
Зовнішній вигляд	Поверхня чиста, з відбитками серп'янки. Кірка відсутня. Встановлена незначна деформація головки

За огляду зрізів головок сиру колір був гомогенним без сторонніх забарвлень і зональності. За консистенцією та зовнішнім виглядом бринза із I дослідної групи відповідала вимогам чинного нормативного документу.

Доведено, що після 20 діб зберігання бринзи, виготовленої за використання стабілізованих сичужних ензимів, екстрагованих із застосуванням суміші кислот, запах, смак, колір, консистенція та зовнішній вигляд продукту не відрізнялись від контролю.

Проводячи органолептичні дослідження зразків бринзи, яку зберігали 40 діб (контрольна група) було виявлено, що у більшій частини зразків відмічали присмак та запах плісняви. Консистенція сиру залишалась однорідною, в міру ламкою. Колір сиру став більш виражено жовтим порівнюючи із даними

отриманими на 20-ту добу зберігання. На більшості поверхні головок сиру із контрольної групи зразків було помітно кірку. Поверхня сиру залишалась чистою (табл. 3.24.).

Виготовлений сир із використанням сичужних ензимів нестабілізованих (І-ша дослідна група) мав незначний присмак плісені. Консистенція бринзи залишалась однорідною. На периферії голівок колір став більш жовтішим. На поверхні голівок було виявлено незначну кірку.

Органолептичні показники бринзи на 40-ву добу зберігання

Таблиця 3.24.

Показник	Характеристика показника
<i>Контрольна група зразків</i>	
Запах та смак	Кисломолочний, з присмаком і запахом плісені
Консистенція	Однорідна, ламка, але не крихка
Колір сирного тіста	Жовтий, більш інтенсивний на периферії голівок
Зовнішній вигляд	Поверхня чиста, з відбитками серп'янки. Незначна кірка. Встановлена незначна деформація головки
<i>I дослідна група зразків</i>	
Запах та смак	Кисломолочний, з слабо вираженим смаком і запахом плісені
Консистенція	Однорідна, ламка, але не крихка
Колір сирного тіста	Жовтий, більш інтенсивний на периферії голівок
Зовнішній вигляд	Поверхня чиста, з відбитками серп'янки. Незначна кірка. Встановлена незначна деформація головки
<i>II дослідна група зразків</i>	
Запах та смак	Кисломолочний, без сторонніх присмаків і запахів
Консистенція	Однорідна, ламка, але не крихка
Колір сирного тіста	Слабо-жовтий, однорідний на всій площі розрізу
Зовнішній вигляд	Поверхня чиста, з відбитками серп'янки. Незначна кірка. Встановлена незначна деформація головки

Бринза виготовлена за використання стабілізованих сичужних ензимів не мала сторонніх присмаків. Консистенція продукту була однорідна. Частинки легко ламались без утворення дрібних крихт. Колір тіста залишався слабкожовтим. На поверхні голівок сформувалась незначна кірка.

Після 60 діб зберігання (табл. 3.25.) зразки із контрольної та I-ї дослідної груп мали кислий смак з вираженим запахом плісені, поверхня ослизла та мала

виражений жовтий колір сирного тіста, неоднорідного за всією масою з вираженою кіркою.

Органолептичні показники бринзи на 60-ту добу зберігання

Таблиця 3.25.

Показник	Характеристика показника
<i>Контрольна група зразків</i>	
Запах та смак	Кислий, з вираженим присмаком і запахом плісені
Консистенція	Однорідна, ламка, але не крихка
Колір сирного тіста	Виражений жовтий, неоднорідний за всією масою
Зовнішній вигляд	Поверхня ослизла. Виражена кірка. Встановлена незначна деформація головки
<i>I дослідна група зразків</i>	
Запах та смак	Кислий, з вираженим присмаком і запахом плісені
Консистенція	Однорідна, ламка, але не крихка
Колір сирного тіста	Виражений жовтий, неоднорідний за всією масою
Зовнішній вигляд	Поверхня ослизла. Виражена кірка. Встановлена незначна деформація головки
<i>II дослідна група зразків</i>	
Запах та смак	Кисломолочний, з слабо вираженим смаком і запахом плісені.
Консистенція	Однорідна, ламка, але не крихка
Колір сирного тіста	Жовтий, неоднорідний за всією масою
Зовнішній вигляд	Незначне ослизнення. Незначна кірка. Встановлена незначна деформація головки

Зразки II-ї дослідної групи за показниками органолептичної оцінки мали кращі результати порівняно зі зразками бринзи у контрольній та I-й дослідній групах. Зокрема, вони відрізнялися слабо вираженим смаком і запахом плісені, менш вираженим ослизненням поверхні та менш вираженим жовтим кольором, що є позитивним результатом, та свідчить про перспективність використання запропонованої технології за виготовлення бринзи.

Застосування стабілізованих сичужних ензимів, одержаних за методикою де для екстракції було використано суміш кислот за технології виготовлення бринзи пролонгує її зберігання, що підтверджується органолептичними показниками. Результати цих досліджень відображені у наукових працях [75].

3.3.2. Амінокислотний склад сироватки, молока та бринзи за використання різних ензимів

Для постановки досліду було сформовано III групи проб молока ($n=5$). У контрольній групі проб для зсідання молока використовували сичужний ензим мікробіального походження. У I-й дослідній групі проб застосовували ензимний препарат із сичугів молочних телят, екстрагований за методикою з використанням розчинів хлористого натрію. У II-й дослідній групі застосовували ензимний препарат, який екстрагували із сичугів молочних телят за методикою із використанням суміші молочної та соляної кислот.

Встановлено, що вміст лізину у молоці, яке було використане для досліду становив на рівні 0,198 г/100 г. Вміст триптофану - 69,6 % від вмісту лізину. Вміст метіоніну і цистину був меншим відносно вмісту лізину на 48,4 %. Найнижчий вміст у молоці був гліцину. Показник був нижчим вмісту лізину у 3,0 рази. У 2,38 рази нижчим був вміст гістидину у молоці відносно вмісту лізину (табл. 3.26.).

У молоці найвищий вміст припадав на глютамін. У міру зниження концентрації амінокислоти були розміщені в наступній послідовності: лейцин, фенілаланін + тирозин, пролін, лізин, серин, аспарагін, ізолейцин, валін, триптофан, гістидин та гліцин.

Амінокислотний склад дослідного молока, г/100 г

Таблиця 3.26.

Назва амінокислот	Вміст
Лізин	0,198
Метіонін+Цистин	0,102
Триптофан	0,138
Валін	0,145
Лейцин	0,296
Ізолейцин	0,150
Фенілаланін+Тирозин	0,288
Пролін	0,247

Продовження таблиці 3.26

Серин	0,173
Аланін	0,119
Гліцин	0,066
Гістидин	0,083
Аргінін	0,100
Аспарагін	0,172
Глутамін	0,561

Слід зазначити, що вміст амінокислот у сировині вірогідно не відрізнявся від стандартних показників молока.

Вивчаючи вплив різних заквасок на вміст амінокислот у сироватці молока після коагуляції згустку виявлено, що за дії ензимів мікробного походження (контрольна група) вміст лізину становив 0,044 г в 100 г (табл. 3.27.).

Використовуючи ензимний препарат із сичугів телят, одержаний за використання розчинів хлористого натрію (І-ша дослідна група), вміст лізину в сироватці молока був меншим на 9,0 % відносно контролю. У сироватці молока із II-ї дослідної групи (використання ензимів із сичугів телят, одержаних за використання суміші кислот) вміст лізину був меншим на статистично значущу величину, порівнюючи із контрольною групою. Різниця була в межах 13,6 %.

Встановлено зменшення у межах похибки метіоніну та цистину у сироватці молока із I- та II-ї дослідних груп відносно показника у контролі. Досліджуючи вміст триптофану, виявлено зменшення цієї амінокислоти у сироватці із II-ї дослідної групи на 18,18 % відносно контролю. Різниця мала прояв тенденції. Різниця за цією амінокислотою між контролем та I-ю дослідною групою становила 9,1 %. Підвищення амінокислоти у сироватці молока із контрольної групи було в межах похибки.

Доведено, що вміст лейцину та ізолейцину був нижчим у сироватці молока за використання натуральних (І-ша дослідна група) та стабілізованих ензимних препаратів екстрагованих із сичугів телят. Різниця була в межах похибки. Встановлено, що в сироватці молока із II-ї дослідної групи проб вміст

амінокислот фенілаланіну та тирозину був нижчим, відповідно, на 11,5 та 4,2 % порівняно із контрольною та І-ю дослідною групами.

За дії нативних та іммобілізованих ензимних препаратів із сичугів телят (І-та ІІ-га дослідні групи проб) знижується вміст проліну, аланіну, гістидину та аспарагінової кислоти у сироватці молока відносно показників, які отримували за дії ензимів мікробного походження (контрольна група). Порівнюючи дослідні групи між собою доведено, що у ІІ-й дослідній групі проб вміст проліну, аланіну та гістидину був нижчим, відповідно, на 8,3, 13,0 та 16,7 % відносно І-ї дослідної групи.

Амінокислотний склад сироватки, г/100 г

Таблиця 3.27.

Амінокислота	Контрольна група	І дослідна група	ІІ дослідна група
Лізин	0,044±0,0060	0,040±0,0043	0,038±0,0030*
Метіонін + Цистин	0,009±0,0022	0,008±0,0012	0,008±0,0017
Триптофан	0,011±0,0021	0,010±0,0032	0,009±0,0007
Валін	0,031±0,0026	0,028±0,0014	0,026±0,0013
Лейцин	0,085±0,0042	0,082±0,0033	0,079±0,0028
Ізолейцин	0,050±0,0047	0,048±0,0053	0,048±0,0019
Фенілаланін + Тирозин	0,026±0,0017	0,024±0,0035	0,023±0,0026
Пролін	0,027±0,006	0,024±0,0021	0,022±0,0018
Серин	0,018±0,0035	0,016±0,0027	0,016 ±0,003*
Аланін	0,025±0,0021	0,023±0,0019	0,020±0,0017
Гліцин	0,005±0,0004	0,004±0,0002	0,003±0,0003*
Гістидин	0,006±0,0004	0,006±0,0003	0,005±0,002
Аргінін	0,029±0,0012	0,025±0,0014	0,023±0,0009*
Аспарагінова кислота	0,014±0,0009	0,016±0,0011	0,016±0,0008
Глутанін	0,120±0,0012	0,108±0,0007**	0,102±0,0014**

Примітка: відносно з контрольною групою.* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$

Доведено, що використання для згортання молока іммобілізованих сичужних ензимів призводить до статистично значущого зниження у сироватці

молока серину відносно контрольної групи. Різниця між групами становила 11,1 %.

Встановлено статистично значуще зменшення вмісту гліцину, аргініну та глутаніну у сироватці молока II-ї дослідної групи проб. Різниця із контрольною групою становила, відповідно, 40,0; 20,7 та 15,0 %.

Отже, встановлено, що використання іммобілізованих ензимів із сичугів телят екстрагованих сумішшю кислот (II-га дослідна група) призводить до зниження вмісту замінних і незамінних амінокислот у сироватці молока.

Також були проведені дослідження визначення вмісту амінокислот у зразках бринзи, виготовленої за використання різних форм ензимів. У сирі одержаному за використання нативних та іммобілізованих сичужних ензимів телят (I- і II-га дослідні групи проб) вміст лізину був вищий, відповідно, на 0,08 та 0,51 % у порівнянні із контрольною групою.

Встановлено підвищення метіоніну + цистину у сирах із II-ї дослідної групи відносно контролю на 0,07 %. Вміст триптофану і валіну у сирі із II-ї дослідної групи проб був вищим ніж у контрольній, відповідно, на 0,2 та 0,07 %.

Вміст лейцину та ізолейцину у пробах бринзи із II-ї дослідної групи був вищим, ніж контрольній та I-й дослідній групах проб, відповідно, на 10,5 і 6,5 та 6,7 і 0,2 %. Показники вмісту фенілаланіну + тирозину, проліну, серину, гліцину, гістидину, аргініну, аспарагінової кислоти та глутаніну у сирах із II-ї дослідної групи проб були вищими, ніж у контрольній групі, відповідно на 0,6; 0,074; 0,18; 0,46; 0,38; 0,13; 0,15 та 0,6 % (табл. 3.28.).

Амінокислотний склад сиру (% від загальної кількості) (n=5)

Таблиця 3.28.

Амінокислота	Група		
	контрольна	I дослідна	II дослідна
Лізин	5,46	5,54	5,97
Метіонін + Цистин	3,47	3,51	3,54
Триптофан	3,92	4,03	4,12
Лейцин	9,14	9,48	10,10
Валін	4,21	4,26	4,28
Ізолейцин	4,30	4,58	4,59
Фенілаланін + Тирозин	10,3	10,5	10,90
Серин	4,82	5,0	5,0
Пролін	9,46	9,79	10,20
Аланін	2,18	2,46	2,64
Гліцин	1,96	2,14	2,34
Гістидин	2,02	2,08	2,40
Аргінін	3,12	3,21	3,25
Аспарагінова кислота	5,02	5,18	5,17
Глутанін	15,82	16,31	16,42

Експериментально доведено, що за використання іммобілізованих ензимів екстрагованих із сичугів телят (II-га дослідна група) трансформація амінокислот молока у бринзу найвища.

За використання іммобілізованих сичужних ензимів, одержаних за застосування суміші кислот (II-га дослідна група) встановлено ефективнішу трансфоормачію білків, а відповідно і амінокислот із молока у сирну масу у порівнянні із групами, де використовували ензимний препарат мікробного походження (контрольна група) та сичужні ензими, одержані за методикою із використанням лише розчинів хлориду натрію (I-ша дослідна група). Результати досліджень наводяться в працях [74].

3.3.3. Дослідження мікробіологічного складу бринзи залежно від використання різної форми ензимів

Наразі залишається не вивченим питання, як впливають на мікробіологічний склад бринзи різні сичужні ензими.

Під час застосування різних ензимних препаратів особливого значення набуває рівень вмісту молочнокислої мікрофлори, що впливає на якість продукту та термін його зберігання. Тому, нами було досліджено кількісний та якісний склад молочнокислих бактерій у бринзі. Після проведення мікроскопії мазків із зразків бринзи на манітол-сольовому агарі (MSA) ідентифіковано групи молочнокислих бактерій та їх кількість (табл. 3.29.).

Виявлено високу концентрацію молочних бактерій в контрольній групі проб, загальна кількість КУО становила 28×10^5 . У зразках I-ї дослідної групи кількість мікроорганізмів була 31×10^5 , що на 10,7 % більше порівняно з контролем.

Кількість основних молочнокислих бактерій в бринзі, КУО/1г (20 діб зберігання)

Таблиця 3.29.

Показник	Група		
	контрольна	I дослідна	II дослідна
Загальна кількість	28×10^5	31×10^5	33×10^5
з них: <i>Streptococcus salivarius subsp thermophiles</i>	16×10^5	18×10^5	19×10^5
<i>Lactococcus lactis subsp cremoris.</i>	12×10^5	13×10^5	14×10^5

Найбільша кількість загальних мікроорганізмів на 20 добу зберігання спостерігалось у зразках II-ї дослідної групи проб і становил 33×10^5 КУО, що на 17,8 % більше ніж у продукті із контролю.

Диференціюючи бактеріальний склад посівів із бринзи виявлено, що у контролі показник КУО *Streptococcus salivarius subsp thermophiles* був на рівні

16×10^5 . Кількість цих бактерій в бринзі із I-ї дослідної групи була на 12,5 % більшою ніж у контрольній групі. За посіву із проб сиру II-ї дослідної групи встановлено, що показник КУО *Streptococcus salivarius subsp thermophiles* був вищим ніж у контролі та I-й дослідній групі, відповідно, на 18,7 та 5,5 %.

Streptococcus salivarius subsp. thermophilus - термофільний молочнокислий стрептокок, що характеризується повною безпекою для здоров'я людини, яка підтверджена багаторічним досвідом їх використання у виробництві різних харчових продуктів, зокрема бринзи.

Однією з властивостей молочнокислих стрептококів є здатність окремих штамів синтезувати полісахариди. Мікробні полісахариди мають виражені імуностимулювальні властивості. Антиоксидантні властивості деяких штамів молочнокислих стрептококів є додатковим чинником, що перешкоджає утворенню пухлин. Виявлено протизапальні властивості окремих штамів молочнокислих стрептококів. Клітини молочнокислих стрептококів є джерелом активних травних ензимів, зокрема β -галактозидази (лактази) – ензиму, що гідролізує лактозу. Використання таких бактерій становить інтерес у зв'язку зі збільшенням кількості людей, які страждають непереносимістю молока через дефіцит цього ензиму.

Аналогічно було встановлено підвищення показника КУО *Lactococcus lactis subsp cremoris* у зразках бринзи із I- та II-ї дослідної груп. Різниця із контрольною групою становила, відповідно, 8,3 та 16,6 %. Підвищення кількості позитивної мікрофлори в сирах може бути свідченням вищої біодоступності поживних речовин для бактерій зокрема амінокислот.

Встановлено, що на 40 добу зберігання у деяких пробах сирів підвищилась загальна кількість мікроорганізмів. У контрольній групі загальна кількість мікроорганізмів збільшилась на 7,1 % відносно показника на 20 добу зберігання (табл. 3.30.).

Кількість основних молочнокислих бактерій в бринзі, КУО/1 г (40 діб зберігання)

Таблиця 3.30.

Показник	Контрольна група	I дослідна група	II дослідна група
Загальна кількість	30×10^5	31×10^5	34×10^5
з них: <i>Streptococcus salivarius subsp thermophiles</i>	18×10^5	20×10^5	24×10^5
<i>Lactococcus lactis subsp cremoris.</i>	12×10^5	11×10^5	10×10^5

Збільшення загальної кількості бактерій було зафіксовано також у зразках бринзи із II-ї дослідної групи. Показник різнився із даними отриманими на 20 добу на 3,0 %. Встановлено зміну співвідношення показників КУО *Streptococcus salivarius subsp thermophiles* до кількості клітин *Lactococcus lactis subsp cremoris*. У контрольній групі співвідношення становило 1,5 до 1,0. У II-й дослідній групі це співвідношення становило 2,4 до 1,0. На 40 добу зберігання встановлено зниження кількості клітин *Lactococcus lactis subsp cremoris* у бринзі із I- та II-ї дослідних груп, відповідно, на 15,3 та 28,5 % відносно показника на 20 добу зберігання сиру.

Із 40 до 60 доби зберігання відмічали зниження загальної кількості бактерій у зразках бринзи із контрольної та I-ї дослідної групи. Найменша кількість *Lactococcus lactis subsp cremoris* була у бринзі із контрольної групи (табл. 3.31.).

Кількість основних молочнокислих бактерій в бринзі, КУО/1г (60 доба зберігання)

Таблиця 3.31.

Показник	Контрольна група	I дослідна група	II дослідна група
Загальна кількість	28×10^5	29×10^5	34×10^5
з них: <i>Streptococcus salivarius subsp thermophiles</i>	16×10^5	17×10^5	19×10^5
<i>Lactococcus lactis subsp cremoris.</i>	12×10^5	13×10^5	15×10^5

Порівнюючи загальну кількість бактерій у сирах із II-ї дослідної групи до показника у цій самій групі станом на 40 добу зберігання, то змін не відбулося. У контрольній групі кількість *Streptococcus salivarius subsp thermophiles* знизилась на 11,1 % відносно даних отриманих на 40 добу експерименту. У I- та II-й дослідних групах зменшення показника КУО *Streptococcus salivarius subsp thermophiles* відносно показників на 40 добу зберігання становило, відповідно, 15,0 та 20,8 %. Водночас кількість *Lactococcus lactis subsp cremoris* зросла, відповідно, на 18,1 та 50,0 % відносно даних отриманих на 40 добу експерименту.

За посіву на поживному середовищі виявлено зміни інтенсивності розміщення колоній. За розташуванням колоній, їх кольором та формою проводили ідентифікацію мікроорганізмів висіяних, із контрольних та дослідних зразків бринзи.

На посівах основними колоніями виявились *Streptococcus salivarius subsp thermophiles* та *Lactococcus lactis subsp cremoris* (рис. 3.1-3.9.).

Клітини молочнокислих стрептококів мають сферичну або овальну форму розміром в діаметрі 0,5-1,2 мкм, розташовуються попарно або у вигляді ланцюжків різної довжини.

Lactococcus lactis subsp cremoris має кокоподібну форму із розмірами до 0,5-1,5 мікрон завдовжки, зазвичай у вигляді пар або коротких ланцюжків, залежно від умов вирощування *Lactococcus lactis subsp cremoris* не формує спор і є нерухомими бактеріями.

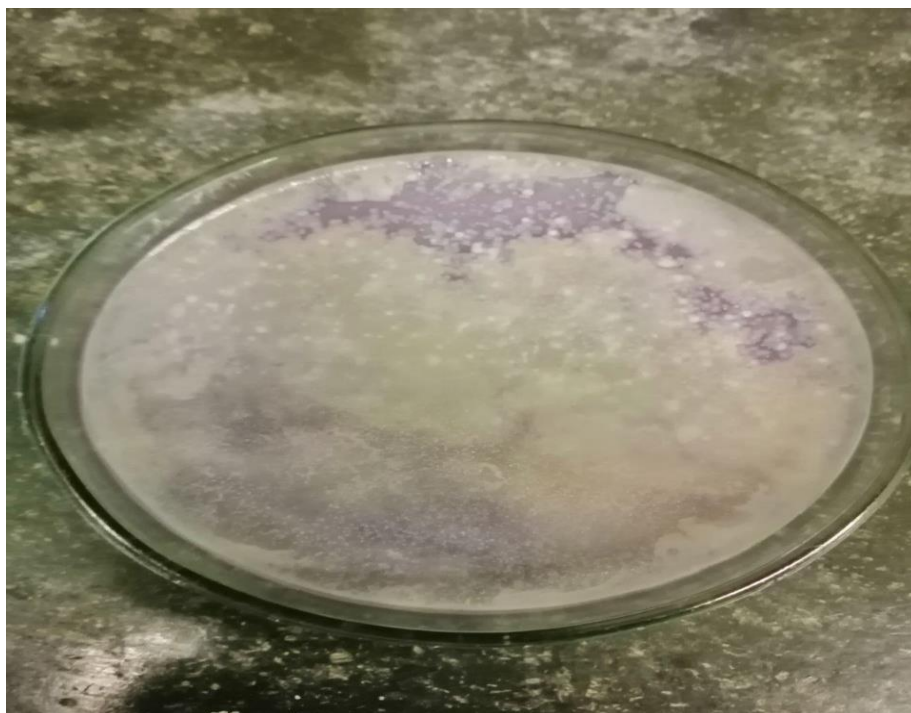


Рис. 3.1. Ріст колоній бактерій, висіяних на (MSA) із бринзи, яку зберігали 20 діб (контрольна група)



Рис. 3.2. Ріст колоній бактерій, висіяних на (MSA) із бринзи, яку зберігали 40 діб (контрольна група)

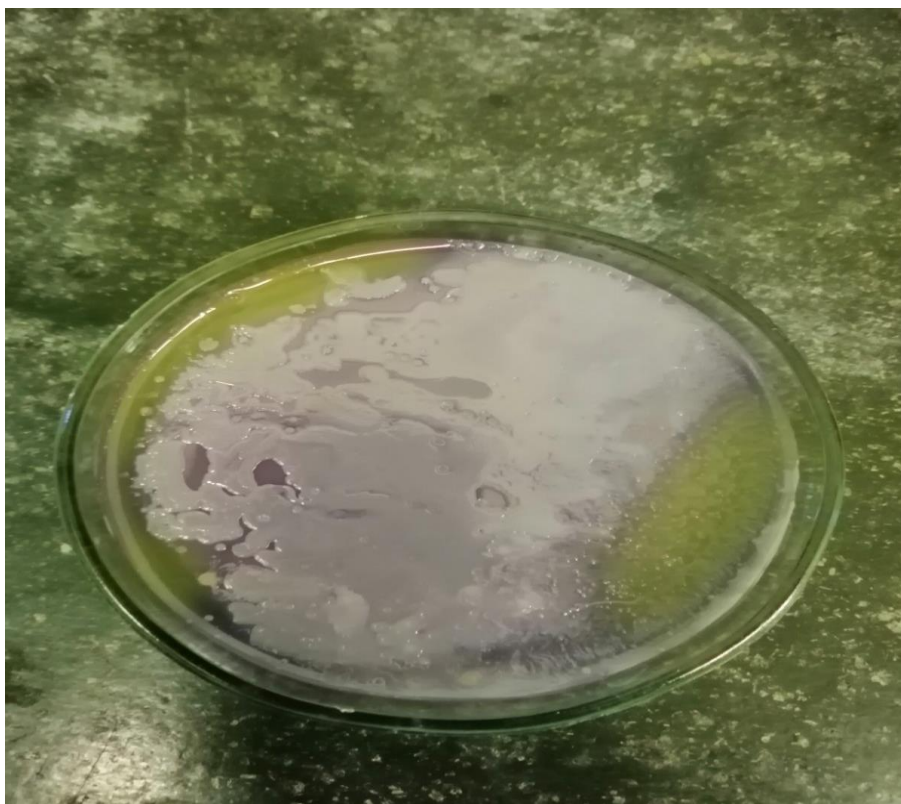


Рис. 3.3. Ріст колоній бактерій, висіяних на (MSA) із бринзи, яку зберігали 60 діб (контрольна група)

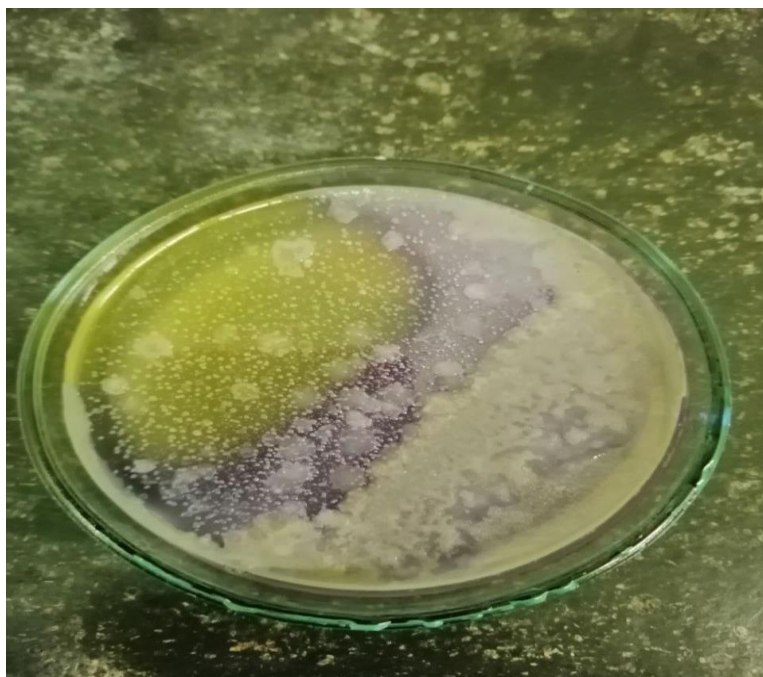


Рис. 3.4. Ріст колоній бактерій, висіяних на (MSA) із бринзи, яку зберігали 20 діб (І дослідна група)

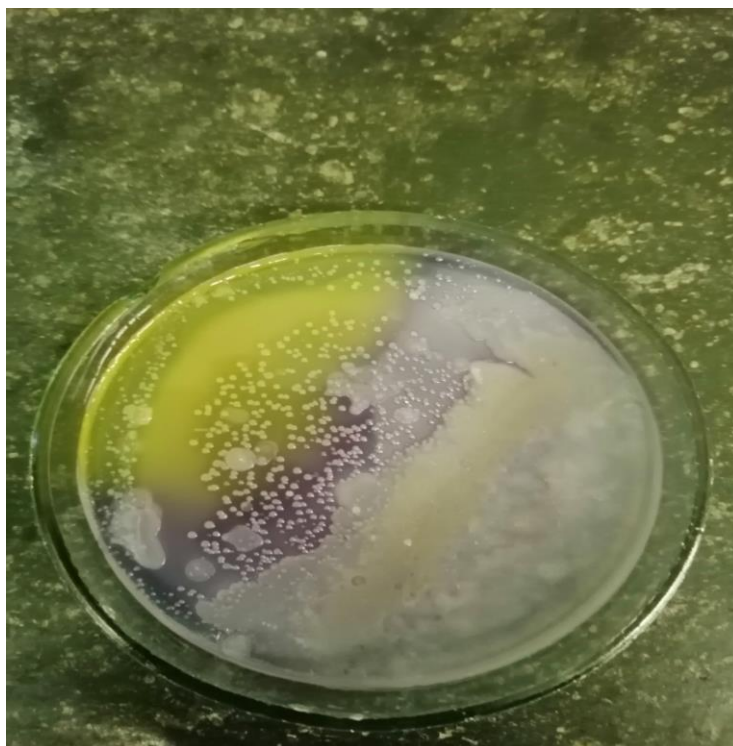


Рис. 3.5. Ріст колоній бактерій, висіяних на (MSA) із бринзи, яку зберігали 40 діб (І дослідна група)



Рис. 3.6. Ріст колоній бактерій, висіяних на (MSA) із бринзи, яку зберігали 60 діб (І дослідна група)

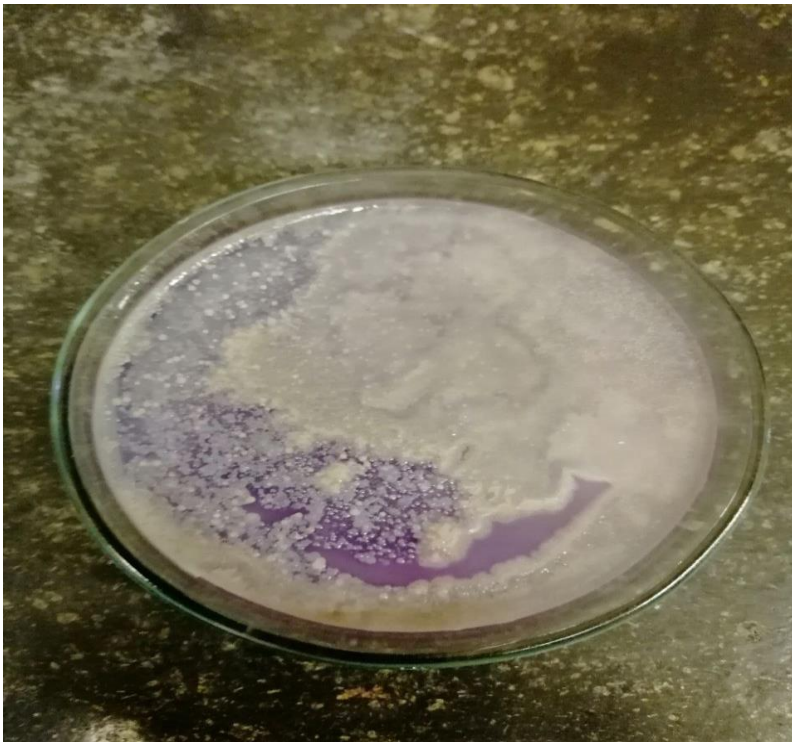


Рис. 3.7. Ріст колоній бактерій, висіяних на (MSA) із бринзи, яку зберігали 20 діб (II дослідна група)

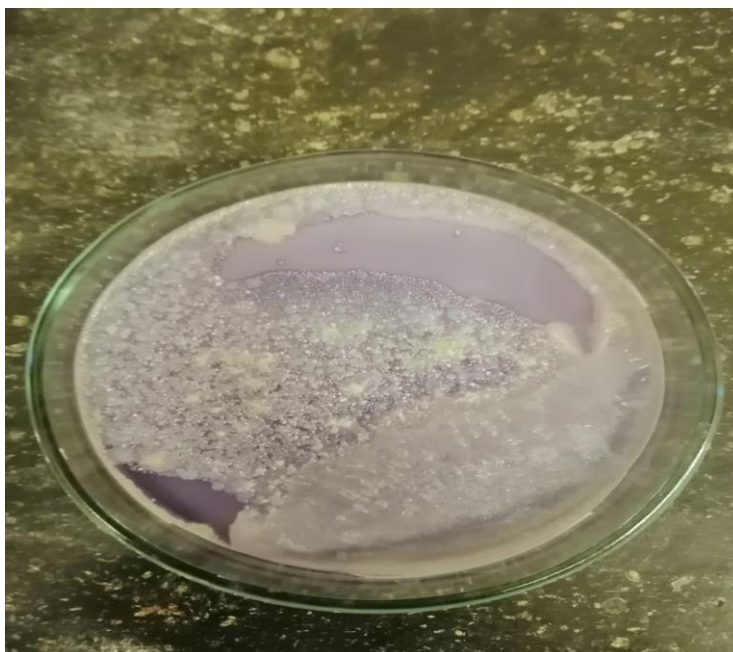


Рис. 3.8. Ріст колоній бактерій, висіяних на (MSA) із бринзи, яку зберігали 40 діб (II дослідна група)



Рис. 3.9. Ріст колоній бактерій, висіяних на (MSA) із бринзи, яку зберігали 60 діб (II дослідна група)

Про наявність бактерій роду *Staphylococcus aureus* свідчили жовті колонії і зміна рН середовища (з фіолетового на жовтий) у зразках контрольних та дослідних груп уже з 20 доби зберігання. Посіви із зразків II-ї дослідної групи мали виражений ріст колоній окремими групами на середовищі на якому культивували мікроорганізми. В процесі росту мікроорганізмів середовище не змінило забарвлення у зразках відібраних як на 20 так і на 60 добу зберігання, проте мало незначне помутніння. У контролі на відміну від II-ї дослідної групи проб колонії не мали окремих груп і зливалися одні з іншими, середовище на якому культивували мікроорганізми мало значні помутніння та містило сліди пліснявих грибків.

Отже, можна вважати, що використання іммобілізованих сичужних ензимів за технології виробництва бринзи пролонгує зберігання готового продукту та зберігає усі корисні молочнокислі мікроорганізми. Оптимальний час зберігання бринзи за використання іммобілізованих сичужних ензимів може становити до 60 діб. Результати цих досліджень відображені у наукових працях [72].

3.3.4. Реологічні дослідження бринзи

Встановлено, що показник високоеластичного модуля у контролі був на рівні 490,1 Па. За технології бринзи, де застосовували сичужний ензим отриманий сольовим розчином показник високоеластичного модуля (І-ша дослідна група) був вищим ніж у контролі на 6,1 %. Різниця не мала статистичної значущості (табл. 3.32).

Реологічні показники бринзи отриманої за використання різних ензимів Таблиця 3.32.

Показник	Контрольна група	І дослідна група	ІІ дослідна група
Високоеластичний модуль, Па	490,1±12,42	520,3±17,55	509,4±19,77
Умовно миттєвий модуль пружності, Па	1084,2±27,43	980,7±47,21	993,2±39,63
Відносна пружність, %	25,3±1,27	24,3±1,77	23,9±1,43
Відносна пластичність, %	10,9±0,67	11,2±1,15	11,8±1,05
Відносна еластичність, %	62,5±2,33	64,2±1,98	64,8±3,18

Не встановлено статистично значущого підвищення показника високоеластичного модуля у зразках бринзи, виготовленої за використання сичужних ензимів екстрагованих сумішю кислот.

Виявлено, що найвищий показник умовно миттєвого модуля пружності був у сирах із контрольної групи. Зразки бринзи із І- та ІІ-ї дослідних груп мали менший показник умовно миттєвого модуля пружності відносно контролю, відповідно, на 9,5 та 8,3 %. Різниця мала прояв тенденції.

Показник відносної пружності у сирах із І-ї дослідної групи був нижчим на 1,0 % у порівнянні із контрольною групою. Різниця була в межах похибки. Не виявлено статистично значущого зниження показника відносної пружності зразків бринзи у зразках із ІІ-ї дослідної групи порівняно із контролем. Між дослідними групами розбіжність також була в межах похибки.

Найвища відносна пластичність встановлена у сирах, отриманих за використання сичужних ензимів екстрагованих сумішю кислот. Різниця була в межах 0,9 % і не мала статистично значущої величини. Збільшення показника відносної пластичності у сирах із I-ї дослідної групи теж не було статистично значущим.

Відносна еластичність сирів у дослідних групах була збільшена, відповідно, на 1,7 та 2,3 % відносно показника у контрольній групі. Різниця між групами була в межах похибки.

Отже доведено, що за виробництва сиру із застосуванням сичужних ензимів, екстрагованих із біоматеріалу за використання суміші кислот, реологічні показники бринзи (відносна еластичність, відносна пластичність, відносна пружність, показник високоеластичного модуля та умовно миттєвий модуль пружності) статистично не відрізняються від показників у сирах, виготовлених за використання сичужних ензимів отриманих поширеним методом.

3.4. Економічна доцільність іммобілізації сичужних ензимів та їх використання за технології бринзи

Аналізуючи економічну ефективність результатів господарської перевірки в ТОВ «Земля Томилівська» встановлено, що застосування стабілізованих сичужних ензимів має вплив на показники економічної ефективності технології бринзи.

За використання іммобілізованих сичужних ензимів витрати переробки партії молока зростають на 55,0 грн (табл. 3.33.).

Економічні показники застосування іммобілізованих сичужних ензимів в умовах молочного цеху ТОВ «Земля Томилівська» Таблиця 3.33.

Показник	Контроль	Дослід
Використано молока для технології бринзи, кг	1100	1100

Продовження таблиці 3.33

Масова частка жиру у молоці, %	3,4	3,4
Вартість витраченого молока, грн	20020,0	20020,0
Вартість ензимів для сквашування, грн	690,0	745,0
Заробітна плата за переробки партії молока, грн	2800,0	2800,0
Відрахування на амортизацію, грн	1040,0	1040,0
Початок утворення молочного згустку, хв	22,0	23,0
Час формування згустку, хв	38,0	38,0
Одержано бринзи із однієї партії молока, кг	129,8	137,5
Собівартість 1 кг сиру, грн	189,1	178,9

Сквашування молока іммобілізованими сичужними ензимами сприяє підвищенню виходу готового продукту на 5,9 % відносно варіанта з застосуванням ензимів мікробіального походження. Собівартість бринзи у дослідному варіанті знижується на 5,4 %.

Проводячи економічний аналіз господарської перевірки в умовах переробного цеху ПП Західний Буг було встановлено, що період сквашування молока як за використання іммобілізованих так і нативних сичужних ензимів був однаковим, що не зумовлювало додаткових витрат енергоносіїв на підтримання необхідної температури (табл. 3.34.).

Економічні показники застосування іммобілізованих сичужних ензимів в умовах молочного цеху ПП Західний Буг

Таблиця 3.34.

Показник	Контроль	Дослід
Використано молока для технології бринзи, кг	600	600

Продовження таблиці 3.34

Масова частка жиру у молоці, %	3,5	3,5
Вартість витраченого молока, грн	12000,0	12000,0
Вартість ензимів для сквашування, грн	330,0	355,0
Заробітна плата за переробки партії молока, грн	1300,0	1300,0
Відрахування на амортизацію, грн	1000,0	1000,0
Початок утворення молочного згустку, хв	20,0	22,0
Час формування згустку, хв	42,0	42,0
Одержано бринзи із однієї партії молока, кг	77,4	82,2
Собівартість 1 кг сиру, грн	188,6	178,3

Витрати на закупівлю сировини, заробітна плата, витрати на амортизацію за переробки 600 кг молока як у контролі так і дослідних групах були однаковими. За введення іммобілізованих сичужних ензимів у молоко під час його сквашування витрати збільшуються на 25,0 грн.

Доведено, що за використання іммобілізованих сичужних ензимів під час сквашування молока вихід бринзи збільшується на 6,2 %. Встановлено зниження собівартості готового продукту у дослідній групі на 5,4 % відносно показника у контролі.

РОЗДІЛ 4. УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Постійною складовою раціонів населення нашої країни та світу є сири, зокрема бринза - продукт складної біотехнологічної переробки молока, в результаті якої відбувається концентрація його основних компонентів з подальшою ферментацією [46, 57].

Сири можна розглядати як біокомплексну екосистему, колонізовану різноманітними групами мікроорганізмів. Водночас сири містять і комплекс жиру, масова частка якого коливається від 10,0 до 60,0 % в сухій речовині, водорозчинні вітаміни, а також метали-біотики [212].

Технологія бринзи передбачає полряд із застосуванням молока корів, кіз та овець також використання сичужних ензимів. Ці біокаталізатори є тваринного, рослинного і мікробіологічного походження. Мікробні і рослинні ензими мають низку недоліків: низький вихід сирів, більш короткий термін їх зберігання та зниження якості вироблених продуктів. Використання натуральних сичужних ензимів тваринного походження за технології бринзи має ряд переваги. Одночасно є проблема виходу ензимів із одиниці маси сичугів та періоду їх зберігання [32].

Дослідження щодо удосконалення екстракції сичужних ензимів із сичугів телят за використання оптимальних екстрагентів дозволяють вирішити проблему щодо підвищення виходу ензимів із одиниці маси біоматеріалу.

Для пролонгування каталітичної активності та підвищення стійкості сичужних ензимів до денатуруючих факторів застосовують їх іммобілізацію на носіях, які є харчовими добавками. Потребує додаткових досліджень застосування харчових добавок для стабілізації сичужних ензимів і встановлення ефективності їх використання в технології бринзи.

Перед початком удосконалення технології екстракції сичужних ензимів було перевірено вплив віку телят (від яких отримували біоматеріал для екстракції ферментів) на активність сквашування молока. Сичужні ензими були отримані від телят 2-, 4-, 8-, 12-, 16- та 18- тижневого віку. За допомогою

сичужних ензимів сквашували молоко корів, сліdkували за швидкістю утворення згустку, його органолептичними показниками та титрованою кислотністю сироватки. Нами було доведено, що найшвидше сквашування молока проходило за внесення в нього сичужних ензимів, отриманих від телят віком 2 тижні. Проте використання ензимів від телят віком 4 тижні не призводило до статистично значущого збільшення часу сквашування молока. Доведено, що чим телята були старші, тим початок утворення молочного згустку був довшим, проте якість молочного згустку була у всіх варіантах задовільною. Наші дослідження щодо впливу віку телят на активність сичужних ензимів підтверджуються даними дослідників [216], які стверджують, що за використання пасти виробленої із сичугів ягнят, яких годували натуральним молоком і замінником молока та забивали у віці 20 і 40 діб під час виробництва «Pecorino foggiano» коагуляція овечого молока проходила активно і якість молочного згустку відповідала вимогам технології згаданого вище сиру. Дослідники також наводять інформацію, що у сичузі пропорції між хімозином і пепсином залежать від віку тварин і типу годівлі. Екстракти ензимів від молодих тварин зазвичай мають великий вміст хімозину (близько 80–95 % хімозину і 5–20 % пепсину), від дорослих тварин – значно вищий вміст пепсину (до 80–90 %) [119].

Удосконалюючи метод екстракції сичужних ензимів, досліджували різні екстрагенти та величину подрібнення біоматеріалу. На першому етапі було встановлено, що кількість екстрагованих білків із подрібнених сичугів залежить від концентрації соляної кислоти в екстрагенті. Доведено, що використовуючи лише одну соляну кислоту найвищий вміст екстрагованих білків, зокрема сичужних ензимів, було отримано за співвідношення 0,2 г : 10,0 см³ : 0,8 см³ (гомогенат сичугів : об'єм дистильованої води : об'єм соляної кислоти).

За дослідження екстракції ензимів сумішшю соляної та молочної кислот доведено, що додавання молочної кислоти в екстрагент позитивно впливає на екстракцію ензимів із гомогенатів сичугів. Найвищий показник спостерігався у

варіанті із додаванням 0,25 см³ молочної кислоти і переважав показник у контролі.

Встановлено вплив різних концентрацій соляної і лимонної кислот на екстракцію білків із сичугів телят. Чим концентрація лимонної кислоти у розчині була вищою, тим кількість екстрагованих білків була більшою. Враховуючи економічні показники, оптимальним вмістом лимонної кислоти у екстрагенті є 0,25 см³.

За показниками екстракції сичужних ензимів сумішшю соляної кислоти із лимонною у порівнянні із показниками, отриманими за використання розчину соляної кислоти із молочною кислотою встановлено зменшення вмісту білка у екстракті на 35,4 % за додавання в екстрагент лимонної кислоти.

Аналізуючи найвищий вміст загального білка у екстракті, отриманому за використання розчину соляної кислоти із вмістом 30,0 мг натрію хлориду було виявлено, що цей показник був менший, відповідно, на 32,2 та 50,0 % у порівнянні із максимальними показниками вмісту загального білка у екстрагентах, отриманих за використання суміші соляної кислоти із лимонною та суміші соляної кислоти із молочною.

Порівнюючи різні екстрагенти (розчин соляної кислоти + молочна кислота; розчин соляної кислоти + лимонна кислота; розчин соляної кислоти + натрій хлорид) найефективнішим екстрагентом виявилась суміш соляної і молочної кислот.

Підвищена екстракція сичужних ензимів із подрібненого біоматеріалу може обґрунтовуватись створенням оптимального середовища за складом та кислотністю, яке максимально сприяє вилученню ензимів із сичугів. Тобто експериментально вдалось підібрати оптимальне рН та екстрагенти, які стимулюють екстракції сичужних ензимів. Наші дослідження співпадають із даними Е.Е. Moschoroulou et al. (2006), які стверджують, що на показники екстракції впливає зниження рН до 4,0-5,7, в результаті чого відбувається неповна денатурація баластних сполук, екстрагованих з біоматеріалу та активуються нативні ензими тканин сичугів (протеїнази), кокрема створюються

умови для переходу попередників компонентів екстракту із сичугів (пепсиноген та реннін) з тканин у розчин. Оптимізація рН до 4,0-5,7 дозволяє не тільки проводити процес подальшої екстракції в зоні стабільності ензимів, а також створює умови для поступового перетворення (прореннін і пепсиноген) в активні ферменти (реннін та пепсин). Більшою мірою це стосується до ренніну, оскільки його вміст становить 62-88 % у сичужних ензимах [117].

Після встановлення оптимального екстрагента, наступним етапом роботи було відпрацювання технологічних режимів екстракції сичужних ензимів. На першому етапі визначали вплив величини подрібнення (від 0,03-0,4 до 0,03-2,0 мм) сичугів на показники екстракції із них білків, зокрема ензимів здатних сквашувати молоко. Виявлено вплив величини подрібнення на показники елімінації ензимів із подрібнених сичугів. За використання подрібнених сичугів із величиною часток 0,03-0,4 мм вміст загального білка у екстракті становив 89,5 мг/дм³. Встановлено, що оптимальний розмір часток сичуга для екстракції становив 0,03-0,6 мм оскільки показники вмісту загальних білків для цієї групи проб були найвищими відповідно до результатів даних інших груп. Підвищення розмірів часток сичугів призводить до тенденції зниження екстракції із них ензимів, що може пояснюватись зменшенням дії екстрагента на біоматеріал.

Також проводили дослідження щодо визначення оптимального часу екстракції ензимів із сичугів з огляду на те, що не було знайдено інформації про час екстракції сумішш'ю кислот із біоматеріалу, подрібненого до величини часток 0,03-0,4 мм. Доведено, що найменша кількість білків екстрагується із сичугів сумішш'ю кислот за 6,0 годин екстрагування. Оптимальним часом екстрагування було встановлено 20 годин. За таких умов вміст білків, зокрема сичужних ензимів у розчині становив 89,2 мг/дм³. Підвищення часу екстракції на дві години не супроводжувалось збільшенням концентрації сичужних ензимів у екстракті. Обґрунтуванням такого явища може бути те, що збільшення часу експозиції призводить до ресорбції ензимів на біоматеріал.

Для пролонгованого зберігання сичужних ензимів доцільно їх іммобілізувати та висушувати до вмісту вологи 7,0-9,0 %. Швидкість

висушування залежить від вмісту води у препараті, яка утворюється під час його стабілізації. Для подальшого висушування іммобілізованих сичужних ензимів об'єм розчину останніх має бути найменший. Тому, вивчали оптимальне співвідношення маси джерела ензимів (гомогенат сичугів) до об'єму екстрагента, за якого кількість екстрагованих білків буде найбільшою.

Оптимальним співвідношенням, за якого не виявлено статистично значущого зниження показника екстракції білків, зокрема і ензимів із подрібнених сичугів було 1 : 16,57. Різниця не перевищувала показника похибки.

Найменший показник екстракції ензимів із підготовленого біоматеріалу було виявлено за співвідношення 1 : 2,76. Одержані дані були меншими відносно контрольної групи на 49,7 % ($p < 0,001$). Поясненням такого явища може бути те, що за незначних об'ємів рідини екстракція проходить не повною мірою.

Отже, доведено, що оптимально мінімальним співвідношенням гомогенату сичугів до розчину мінерально-органічних кислот є 1 (маса) до 16,57 (об'єм). Зменшення об'єму екстрагента нижче цього показника призводить до статистично значущого зниження вилучення білків із гомогенату сичугів.

Стабілізацію проводили фізичним методом адсорбції за допомогою постійного перемішування розчинів ензимів із носіями за наявності спейсера. Як носії використовували суху сироватку та сухе молоко. Ефективність іммобілізації ензимів перевіряли за сквашування ними молока корів, визначаючи час початку цього процесу.

Виявлено, що за використання ензимів іммобілізованих на сухій сироватці найшвидше формувався молочний згусток, де сквашування проводили стабілізованими ензимами за об'ємом екстракту 9,0 та 10,0 см³. У цих варіантах на 60 хвилину ферментації молочний згусток був щільним і відповідав чинним вимогам.

Також було проведено дослідження щодо встановлення ефективності сквашування молока сичужними ензимами, іммобілізованими на сухому молоці. Доведено, що за використання ензимів, стабілізованих із 10,0 см³ екстракту сквашування молока розпочиналось найшвидше. Молочний згусток був в міру щільний і добре різався.

Порівнюючи ефективність використання сичужних ензимів, стабілізованих на сухій молочній сироватці та сухому молоці було встановлено, що за додавання ензимів, стабілізованих на сухій сироватці утворення молочного згустку розпочалось на 6,0 хвилин раніше ніж за варіанта з використанням ензимів стабілізованих на сухому молоці.

Вивчали період зберігання іммобілізованих сичужних ензимів. Досліджуючи період придатності сичужних ензимів, іммобілізованих на сухій сироватці було встановлено, що за внесення іммобілізованих ензимів, які зберігали продовж 36 місяців за температури 2,0–4,0 °C молочний згусток за 60 хвилин формується щільний. Застосування нативних ензимів не дало можливості отримати сформованого молочного згустку.

Також були проведені дослідження щодо вивчення активності сичужних ензимів за їх зберігання за кімнатної температури. Не встановлено ефективного сквашування молока продовж 60 хвилин ферментації нативними сичужними ензимами, які зберігали продовж 36 місяців. Молочний згусток був не сформований. Внесення іммобілізованих сичужних ензимів після 36 місяців зберігання дозволяє отримати молочний згусток, але із незадовільною щільністю.

Доведено, що іммобілізація сичужних ензимів дозволяє пролонгувати їх активність навіть за зберігання за кімнатної температури продовж 36 місяців. Це підтверджується даними авторів [6], які стверджують, що іммобілізовані на природних органічних носіях ензими є стійкими до денатуруючих факторів і зберігання їх є більш пролонгованим.

Проводили вивчення збереження активності сичужних ензимів, іммобілізованих на сухому молоці.

Застосовуючи іммобілізовані сичужні ензими після трьох років зберігання за температури 2,0–4,0 °C вдалось отримали лише нещільний молочний згусток продовж 60-хвилинної ферментації молока. За додавання нативних сичужних ензимів до молока, які зберігали 36 місяців не вдалось отримати молочного згустку.

Додавання у молоко іммобілізованих сичужних ензимів, які зберігали три роки за кімнатної температури не дозволило ефективно провести згортання молока. Молочний згусток був не сформований.

Доведено, що іммобілізовані сичужні ензими на сухому молоці за температури 2,0–4,0 та 17,0–21,0 °C зберігають свою активність впродовж 33 та 27 місяців. Порівнюючи іммобілізовані ензими на сухій сироватці та сухому молоці було доведено, що ензими стабілізовані на сухій сироватці здатні довше зберігати свою активність на 3 місяці за кімнатної температури у порівнянні із ензимами стабілізованими на сухому молоці, що може пояснюватись значною часткою молочних жирів у матриці, які з часом окислялись і прискорювали зниження активності ензимів. Наявність жирів у іммобілізованих препаратах і постійне надходження Оксигену призводить до утворення пероксидів, які прискорюють реакції окиснення жирів. Водночас перекиси розпадаються з утворенням альдегідів, окисів та інших сполук, які впливають на активні центри ензимів, знижуючи їх активність. Окиснення є вільнорадикальною ланцюговою реакцією, тому вона прискорюється за наявності активних радикалів [6].

З огляду на те, що стабілізовані сичужні ензими набувають нових властивостей, постає питання встановлення їх нешкідливості та токсичності. Для досліджень застосовували лінійних лабораторних тварин. За встановлення нешкідливості стабілізованих сичужних ензимів виявлено, що за десятидобового експерименту летальних випадків у мишей не фіксували.

Не виявлено етологічних змін у лабораторних тварин впродовж перших годин експерименту, яким внутрішньошлунково вводили 0,25 см³ 15,0 % розчину стабілізованих сичужних ензимів. Тварини проявляли позитивну

реакцію на зовнішні подразники. У більшості білих мишей, яким вводили по 0,25 см³ 30,0 % розчину стабілізованих сичужних ензимів продовж перших 2,0-2,5 годин від введення спостерігали незначну пригніченість. Ці тварини загальмовано реагували на зовнішні подразники і менше рухались у порівнянні із контрольними мишами. З часом миші відновлювали рухливість та адекватно і швидко реагували на світлові подразники, дотики та звукові сигнали. У 20,0 % лабораторних тварин (одна голова) впродовж пів доби відмічали розлади шлунково-кишкового тракту. Наприкінці доби клінічні показники цієї тварини були в нормі. За проведення розтину тушок мишей та виконання патолого-анатомічних досліджень доведено, що стан внутрішніх органів тварин із дослідних груп не відрізнявся від стану внутрішніх органів мишей із контрольної групи. Встановлені нами дослідження підтверджують ряд дослідників [11, 12], які стверджують, що за введення лабораторним тваринам модифікованого желатину як носія для іммобілізації закваски для йогурту та стрептосану загибелі мишей за 10-ти добового спостереження не було встановлено. Впродовж перших 2-х годин тварини, яким вводили 5,0 % та 10,0 % розчини модифікованого органічного носія проявляли пригніченість. З часом миші відновили свою рухливість, реагували на зовнішні подразники (світло, дотик, шум), активно споживали корм і пили воду. Тимчасову пригніченість лабораторних тварин та поодинокі розлади шлунково-кишкового тракту можливо обґрунтувати надходженням у організм надмірної кількості харчової білкової добавки – сичужних ензимів, іммобілізованих на сухій сироватці молока.

Проводячи біохімічні дослідження в крові і печінці лабораторних тварин було виявлено, що вміст загального білка, активність амінотрансфераз, вміст загальних, білкових і низькомолекулярних тіолових груп в печінці та вміст глюкози і гемоглобіну у крові не мали статистично значущої різниці із контролем і відповідали фізіологічним нормам. Наші дані підтверджуються результатами досліджень [11], де вказується, що надмірне внутрішньошлункове

введення модифікованого желатину не призводить до блокування сульфогідрильних груп білків і ферментів у печінці дослідних тварин.

Невиявлені зміни концентрації сульфогідрильних груп у печінці лабораторних тварин є підтвердженням відсутності токсичних сполук у іммобілізованих сичужних ензимах.

Одночасно із вивченням нешкідливості визначали гостру токсичність стабілізованих сичужних ензимів на різних лабораторних тваринах (білі миші та щури). Доведено, що введення лінійним мишам розчину сичужних ензимів, у дозах від 5 до 250 мг/кг маси тіла продовж періоду спостереження (14 діб) не викликає змін у їх поведінці. Тварини адекватно реагували на подразники, постійно переміщувались по клітці, активно споживали корм та воду. Не було виявлено летальних випадків у цих групах. Аналогічні дослідження були отримані на білих щурах.

За внутрішньошлункового введення білим мишам та білим щурам іммобілізованих на сухій сироватці сичужних ензимів у дозах від 2000,0 до 5000,0 мг/кг маси тіла встановлено, що за дози ензимів 5000 мг/кг у деяких тварин виявлено розлади функцій шлунково-кишкового тракту. Рухи цих тварин були сповільнені продовж 3-4 годин. Через 6-7 годин після введення ферментів споживання корму та води у тварин повністю відновлювалось. На 36 годину дослідження функціонування шлунково-кишкового тракту у тварин було у нормі.

Доведено, що стабілізовані ензими належать до малотоксичних речовин – 4 клас. DL_{50} стабілізованих сичужних ензимів за внутрішньошлункового введення лінійним мишам та щурам є більшою 5000 мг/кг.

Дані щодо встановлення DL_{50} стабілізованих сичужних ензимів одержали підтвердження у наукових роботах авторів [12], які встановили, що за дози модифікованого желатину як носія для іммобілізації заквасок для молочнокислих напоїв 5000 мг/кг миші на деякий час відмовлялись від корму. Проте через 9–10 годин дослідні миші починали поїдати комбікорм. За

введення найбільшої дози носія не було виявлено суттєвих порушень в поведінці та фізіологічних функціях білих мишей.

Тимчасові порушення у споживанні корму і рухах у мишей та щурів за максимального їм введення іммобілізованих сичужних ензимів можливо обґрунтувати потраплянням у шлунково-кишковий тракт лабораторних тварин великої маси харчової білоквмісної добавки.

Для встановлення ефективності виробництва бринзи із застосуванням іммобілізованої закваски застосовували молоко корів, яке містило 12,22 % сухої речовини, 3,89 % молочного жиру, 3,21 % білка, зокрема 2,17 % казеїну. Вміст молочного цукру у молоці не перевищував вимог стандарту ДСТУ 3662:2018. За сухим знежиреним молочним залишком та вмістом небілкового нітрогену молоко відібране для досліджень відповідало вимогам. Пастеризацію проводили за температури 60–63 °C з витримкою 30 хвилин.

Зберігання зразків бринзи здійснювали за температури 4 °C з постійною вентиляцією. Зразки бринзи для сенсорного аналізу відбирали на 20-, 40- та 60-ту добу зберігання.

Доведено, що у разі застосування стабілізованих сичужних ензимів, одержаних за методикою з використанням суміші соляної та молочної кислот (II-га дослідна група), вихід готового продукту збільшується на 7,7 % відносно контролю де використовували ензими мікробіального походження. Поясненням збільшення виходу бринзи може бути підвищена стабільність сичужних ензимів та додатковий вміст іонів кальцію у препараті, оскільки катіон Ca^{2+} активує ензим і бере участь в стабілізації третинної структури ряду білків. Утворюючи іонні зв'язки з двома різними амінокислотними залишками, іони Ca^{2+} можуть виконувати функцію стабілізуючого містка аналогічно дисульфідним зв'язкам [179].

Доведено, що після 20-ти діб зберігання бринзи, виготовленої за використання стабілізованих сичужних ензимів, екстрагованих сумішшю кислот - запах, смак, колір, консистенція та зовнішній вигляд продукту не відрізнялись від контролю.

Встановлено, що на 40-ву добу зберігання бринза, виготовлена за використання стабілізованих сичужних ензимів не мала сторонніх присмаків. Консистенція сиру була однорідна. Частинки легко ламались без утворення дрібних крихт. Колір тіста залишався слабо жовтим. На поверхні голівок сформувалась незначна кірка.

Після 60-ти діб зберігання бринза, виготовлена за використання іммобілізованих сичужних ензимів мала найменшу кількість вад у порівнянні із сирами, виготовленими із використанням ензимів мікробного походження.

Отже, застосування стабілізованих сичужних ензимів одержаних за методикою з екстракцією сумішшю кислот за технології виготовлення бринзи пролонгує її зберігання, що підтверджується органолептичними показниками.

Проводили дослідження впливу використання іммобілізованих сичужних ензимів на вміст амінокислот у бринзі. Для детального аналізу на першому етапі визначали вміст амінокислот у сировині із якої виготовляли бринзу. Експериментально виявлено, що вміст лізину у молоці, яке було використане для досліду, становив на рівні 0,198 г/100 г. Вміст амінокислот у сировині вірогідно не відрізнявся від стандартних показників молока.

Встановлено, що за використання іммобілізованих сичужних ензимів отриманих із сичугів телят за екстракції сумішшю кислот, зменшується вміст лізину у сироватці молока на 13,6 % відносно контролю. Різниця мала статистично значущу величину. Доведено, що використання іммобілізованих ензимів із сичугів телят, екстрагованих сумішшю кислот, призводить до зниження вмісту замінних і незамінних амінокислот у сироватці молока із якого виготовляли бринзу.

Одночасно були проведені дослідження визначення вмісту амінокислот у зразках бринзи, виготовленої за використання різних форм сичужних ензимів. У сирі, одержаному за використання іммобілізованих сичужних ензимів телят вміст лізину був вищий на 0,51 % у порівнянні із контрольною групою. Також у цих сирах було встановлено підвищення метіоніну + цистину на 0,07 %, триптофану і валіну, відповідно, - на 0,2 та 0,07 %. Показники вмісту

фенілаланіну + тирозину, проліну, серину, гліцину, гістидину, аргініну, аспарагінової кислоти та глютаніну у сирах із II-ї дослідної групи проб були вищими, ніж у контрольній групі, відповідно, на 0,6; 0,074; 0,18; 0,46; 0,38; 0,13; 0,15 та 0,6 %.

Доведено, що за використання іммобілізованих сичужних ензимів, одержаних за екстракції сумішшю кислот встановлено ефективнішу трансформацію білків, а відповідно і амінокислот із молока у сирну масу у порівнянні із групами, де використовували ензимний препарат мікробного походження та сичужні ензими, одержані за методикою із використанням солі.

Досліджували мікробіологічний склад бринзи за використання різних сичужних ензимів. Ідентифіковано групи молочнокислих бактерій та їх кількість. На посівах основними колоніями виявились *Streptococcus salivarius subsp thermophiles* та *Lactococcus lactis subsp cremoris*. Найбільша кількість загальних мікроорганізмів на 20-ту добу зберігання спостерігалась у зразках бринзи, яку було виготовлено за використання іммобілізованих сичужних ензимів, показник становив 33×10^5 КУО, що на 17,8 % більше ніж у продукті із контролю. Встановлено підвищення показника КУО *Lactococcus lactis subsp cremoris* у зразках сиру. Різниця із контрольною групою становила 16,6 %. За посіву із проб сиру, отриманого за участі іммобілізованих ензимів показник КУО *Streptococcus salivarius subsp thermophiles* був вищим ніж у контролі на 18,7 %.

Із 40- до 60-ї доби зберігання спостерігали зниження загальної кількості бактерій у зразках бринзи із контрольної та дослідної груп. Виявлено зменшення показника КУО *Streptococcus salivarius subsp thermophiles* відносно даних на 40-ву добу зберігання на 20,8 %.

Доведено, що за використання іммобілізованих сичужних ензимів під час сквашування молока вихід бринзи збільшується на 6,2 %. Встановлено зниження собівартості готового продукту у дослідній групі на 5,4 % відносно показника у контролі.

ВИСНОВКИ

Виконано комплекс експериментальних робіт з удосконалення способу екстракції сичужних ензимів із сичугів молочних телят, розроблено метод іммобілізації ензимів на природних, органічних носіях та доведено ефективність зберігання і використання стабілізованих сичужних ензимів за технології бринзи.

1. Оптимальним віком телят для відбору сичугів є період до 2 тижнів від дня народження. Оптимальними умовами екстракції сичужних ензимів із біоматеріалу є їх вилучення за використання суміші соляної та молочної кислоти (6Н соляна кислота : дистильована вода: 40,0 % молочна кислота за співвідношення 0,8:10,0:0.25 см³) протягом 12 год. За температури +5 °С за постійного перемішування.

2. Іммобілізація розчинних сичужних ензимів за гідромродуля (маса подрібнених сичугів до об'єму кислот 1:16,57) на сухій сироватці у присутності спейсера (співвідношення: розчинні ензими 9,0 см³ : носій 1000,0 мг 0,25 см³ 1,0 М CaCl₂) підвищується стійкість сичужних ензимів до денатуруючих факторів, пролонгується їх зберігання.

3. Іммобілізовані сичужні ензими на сухій сироватці за температури 2,0–4,0 °С здатні зберігати свою активність більше 36 місяців. Доведено, що сичужні ензими іммобілізовані на сухій сироватці здатні довше зберігати свою активність на 3 місяці за кімнатної температури у порівнянні із ензимами стабілізованими на сухому молоці.

4. Доведена нешкідливість іммобілізованих сичужних ензимів. Ведення білим мишам 0,25 см³ 30,0 % розчину стабілізованих сичужних ензимів не викликає летальних випадків, патолого-анатомічних змін їх внутрішніх органів та біохімічних показників у організмі лабораторних тварин.

5. Препарат стабілізованих сичужних ензимів, належить до малотоксичних речовин – 4 клас. DL₅₀ стабілізованих ензимів за нутрішньошлункового введення білим мишам та щурам є більшою 5000 мг/кг.

6. За технології бринзи під час сквашування молока із використанням сичужних ензимів екстраговані із використанням суміші кислот (соляна + молочна кислота) з послідуною їх стабілізацією вихід підвищується на 7,7 % відносно ензимів мікробіального походження. За використання іммобілізованих сичужних ензимів стабільні органолептичні показники бринзи є пролонгованими.

7. За виробництва бринзи із використанням іммобілізованих сичужних ензимів встановлено присутність *Streptococcus salivarius subsp thermophiles* та *Lactococcus lactis subsp cremoris* у сирі після 60 діб його зберігання за температури 2,0–4,0 °C. Використання іммобілізованих ензимів підвищує трансформацію білка та амінокислот із молока у бринзу.

8. Використання під час виробництва бринзи іммобілізованих сичужних ензимів сприяє підвищенню виходу готового продукту на 6,2 % та зниженню собівартості сиру на 5,4 % відносно варіанту де застосовують ензими мікробіального походження.

ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

1. Для підвищення виходу сичужних ензимів із подрібнених сичугів молочних телят рекомендуємо біоматеріал подрібнювати до величини 0,03-0,6 мм як екстрагент використовувати суміш соляної та молочної кислоти за гідромодуля 1 : 16,57.

2. Для збільшення часу зберігання сичужних ензимів пропонуємо проводити їх іммобілізацію на сухій сироватці за присутності іонів Кальцію.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Антибіотики та антибіотикорезистентні властивості мікроорганізмів молока / В. Данчук та ін. Аграрний вісник Причорномор'я. 2021. № 99. С. 32–47.
2. Білий В. Ю., Мерзлов С. В. (2022). Вплив різноманітних сичужних ферментів на технологічні та сенсорні показники бринзи. Вісник Полтавської державної аграрної академії, (1), 103–109.
<https://doi.org/10.31210/visnyk2022.01.13>
3. Білий В. Ю., Мерзлов С. В. Біотехнологічні методи екстракції хімозину та ефективність їх використання. Аграрна освіта та наука: досягнення, роль, фактори росту. Сучасний розвиток технологій тваринництва. Інноваційні підходи в харчових технологіях: матеріали міжнародної науково-практичної конференції. (Білоцерківський НАУ, 21 жовтня 2021 р.). м. Біла Церква, 2021. С. 51-52.
4. Білий В. Ю., Мерзлов С. В., Мерзлова Г. В., Біла В. В., Машкін Ю. О. Спосіб екстракції сичужних ензимів: патент №156438; № заявки u 202107113; заявлено 10.12.2021; опубліковано 26.06.2024 Бюлетень № 26/2024.
5. Білий В.Ю., Мерзлов С.В. Дія різних сичужних ензимів на показники коагуляції молока. Аграрна освіта та наука: досягнення, роль, фактори росту: Сучасний розвиток технологій тваринництва. Інноваційні підходи в харчових технологіях: матеріали міжнародної науково-практичної конференції (Білоцерківський НАУ, 20 жовтня 2022 р.). БНАУ, м. Біла Церква, 2022. С. 51-53.
6. Біотехнологія: підруч. [для студ. вищ. навч. закл.] / [Герасименко В.Г., Герасименко М.О., М.І. Цвіліховський та ін.]. – К.: Інкос, 2006. – 647 с.
7. Біохімічні методи дослідження крові тварин / Левченко В.І., Новожицька Ю.М., Сахнюк В.В. [та ін.] // методичні рекомендації. – Київ, 2004. – 104 с.

8. Використання технології електророзпилювання рідини «Елекроспрей» з метою активізації сичужного ферменту для виробництва сирів / Л. М. Ладика та ін. Інженерія переробних і харчових виробництв. 2017. № 1. С. 11–14.
9. Власенко В. В. Закваски і їх види у сирі виробництві. Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького. 2016. Т. 18, № 2. С. 157–160.
10. Власенко В. В. Основи сичужного зсідання молока при виробництві твердих сирів. Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С. З. Гжицького. 2011. Т. 2, № 48. С. 336–339.
11. Вовкогон А.Г., Мерзлов С.В. Визначення гострої токсичності модифікованого желатину на білих мишах. *Збірник наукових праць БНАУ*, 2017, 1-2(134), с. 37–41.
12. Вовкогон А.Г., Мерзлов С.В. Вплив модифікованого желатину як харчової добавки на організм білих мишей. *Збірник наукових праць ВНАУ*, 2017, 4(98), с. 227–232.
13. Вплив кількості селену і вітаміну Е у раціоні корів на жирнокислотний склад молока / Ю. П. Білаш та ін. Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького. 2010. Т. 3, № 45. С. 8–13.
14. Галух Б. І. Дослідження жирнокислотного складу молочних сумішей, які використовуються для виробництва бринзи з сировини карпатського регіону. Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького. 2009. Т. 2, № 41. С. 25–29.
15. Галух Б. І. Технологічні режими соління бринзи і їх вплив на якісні показники готового продукту. Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького. 2013. Т. 15, № 1. С. 58-63.
16. Галух Б. І., Дроник Г. В. Інтенсивність протеолізу білків під час виготовлення бринзи з молока різних видів тварин. Прогресивні техніка та технології харчових виробництв ресторанного господарства і торгівлі. 2010. № 2. С. 274–282.

17. Дерев'яненко Н. П., Семенова А. Д. Виготовлення бринзи з вітамінним комплексом. Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С. З. Гжицького. 2016. Т. 1, № 65. С 44–48.

18. Доклінічні дослідження ветеринарних лікарських засобів / [Коцюмбас І.Я., Малик О.Г., Патерега І.П. та ін.]; під ред. І.Я. Коцюмбаса. – Львів: Тріада плюс, 2006. – 360 с.

19. ДСТУ 3662:2018 Молоко-сировина коров'яче. Технічні умови

20. ДСТУ 7065:2009 Бринза. Загальні технічні умови. Наказ від 05.10.2009 № 357

21. ДСТУ ISO 11870:2007 Молоко і молочні продукти. Визначення масової частки жиру. Загальні рекомендації щодо використання методів із застосуванням жиромірів (ISO 11870:2000, IDT).

22. ДСТУ IDF 149A: 2003 Культури молочних заквасок. Визначення видового складу. Київ: Держспоживстандарт України, 2005. 14 с.

23. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986) // Збірка договорів Ради Європи. – К.: Парлам. Вид-во, 2000. – 57 с.

24. Закон України “Про захист тварин від жорстокого поводження” // Відомості Верховної Ради України. – 2006. – № 27. – С. 990.

25. Інноваційні технології харчових виробництв / І. М. Берник та ін. Вінниця: Видавець ФОП Кушнір Ю.В. 2022. 300 с.

26. Корми та кормова сировина. Визначення вмісту амінокислот методом капілярного електрофорезу з використанням системи капілярного електрофорезу «Капель-105/105М»: метод. реком. / І. Я. Коцюмбас та ін.; за ред. І. Я. Коцюмбаса. Львів, 2013. 26 с.

27. Крамаренко О. С. Біохімія молока і молочних продуктів: курс лекцій. Миколаїв: МНАУ. 2017. 96 с.

28. Мерзлов С. В., Білий В. Ю., Риндін А. В. Дія екстрагентів на показники елімінації сичужних ензимів. Наукові горизонти. 2019. № 8. С. 77 -

29. Молочна продуктивність та якісні показники молока і бринзи за використання у раціонах вівцематок БМД оптимізованого складу / Г. М. Седіло та ін. Передгірне та гірське землеробство і тваринництво. 2016. № 59. С. 211–218.

30. Нові технологічні аспекти виготовлення овечої бринзи в умовах високогір'я Українських Карпат / В. Я. Бінкевич та ін. Науковий вісник ЛНУВМБ імені С.З. Гжицького. 2013. Т. 85, № 1. С. 12–17.

31. Перцевой, М. Ф. Дослідження основних реологічних показників сирного продукту закусочного / М. Ф. Перцевой, М. В. Обозна, В. В. Рубіна // Наукові праці НУХТ. – 2011. – № 38. – С. 27–31.

32. Приходько М. Ф. Сиропридатність молока корів української бурої молочної породи та сумського внутріпородного типу української чорно-рябої молочної породи. Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія «Тваринництво». 2013. Т. 7, № 23. С. 178–180.

33. Реологічні методи дослідження сировини і харчових продуктів та автоматизація розрахунків реологічних характеристик [Текст] : навчальний посібник / А. Б. Горальчук [та ін.]. — Харківський державний університет харчування та торгівлі. — Харків, 2006. — 63 с.

34. Рижкова Т. М. Удосконалення технології виробництва кисломолочного сиру, виготовленого із козиного молока. Прогресивні техніка та технології харчових виробництв ресторанного господарства і торгівлі. 2010. Т. 15, № 1. С. 319–326.

35. Розроблення технології сиру «Моцарелла» із застосуванням різних молокозсідальних ферментів / Цісарик О. Й. та ін. Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С. З. Гжицького. 2017. Т. 19, № 75. С. 23–28.

36. Семко Т. В. Перспективні напрямлення в виробництві кислотно-сичужних сирів. Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С. З. Гжицького. 2016. Т. 18, № 2. С. 147–149.

37. Сиропридатність молока корів української чорно-рябої молочної породи з різними генотипами капа-казеїну, бета-лактоглобуліну та пролактину /

О. П. Плівачук та ін. Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва. 2016. № 2. С. 116–121.

38. Скрипніченко Д. М. Підбір заквашувальних композицій для виробництва м'якого пробіотичного сиру. Збірник тез доповідей 75 Наукової конференції викладачів академії, 20-24 квітня 2015 р. Одеса: ОНАХТ, 2015. С. 117-119.

39. Скульська І. В., Цісарик О. Й. Дослідження структурно-механічних показників бринзи за часткової заміни кухонної солі хлоридом калію. Науковий вісник ЛНУВМБТ ім. С.З. Гжицького. 2016. Т. 18, № 2. С. 99–102.

40. Скульська І. В., Цісарик О. Й. Удосконалення технології бринзи з овечого молока шляхом додавання біозахисної культури. Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького. Серія: Харчові технології. 2019. Т. 21, № 91. С. 104–109.

41. Сучасні дослідження властивостей та використання ферментів / А. А. Атаманова та ін. Вісник Хмельницького національного університету. 2020. Т. 5, № 289. С. 257–263.

42. Технологія виготовлення бринзи з коров'ячого молока із застосуванням заквашувального препарату “Ентероплан” / І. І. Кушнір та ін. Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького. Серія: Сільськогосподарські науки. 2022. Т. 22, № 96. С. 9-15.

43. Ткаченко Н. А., Скрипніченко Д. М. Обґрунтування параметрів ферментації молочної основи для виробництва м'яких пробіотичних сирів. Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького. 2015. Т. 17, № 1. С. 1–7.

44. Ткаченко Н. А., Скрипніченко Д. М. Обґрунтування раціонального вмісту молокозсідального ферменту СНУ-МАХ у виробництві м'яких пробіотичних сирів. Харчова наука і технологія. 2014. Т. 211, № 27. С. 24–29.

45. Фари́на Ю. В., Скульська І. В. Чим цікава традиційна Карпатська бринза. Матеріали конференцій МЦНД. 2020. С. 61–63.

46. Шугай М. О., Кігель Н. Ф. Безпечність та якість сиру: як поліпшити мікробіологічні показники молока – сировини. *Продовольчі ресурси*. 2013. № 1. С. 105–116.
47. Abada E. A. Application of microbial enzymes in the dairy industry. *Enzymes in Food Biotechnology: Production, Applications, and Future Prospects*. Elsevier Inc., 2018. P. 61–72.
48. Addis M. et al. The influence of the enzymatic composition of lamb rennet paste on some properties of experimentally produced PDO Fiore Sardo cheese. *Int. Dairy J.* 2005. Vol. 15, № 12. P. 1271–1278.
49. Addis M., Piredda G., Pirisi A. The use of lamb rennet paste in traditional sheep milk cheese production. *Small Rumin. Res.* 2008. Vol. 79, № 1. P. 2–10.
50. Alavi F., Momen S. Aspartic proteases from thistle flowers: Traditional coagulants used in the modern cheese industry. *Int. Dairy J.* Elsevier Ltd, 2020. Vol. 107. P. 104-709.
51. Alkan H. et al. Production of lipase by a newly isolated *Bacillus coagulans* under solid-state. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2007. Vol. 136, № 1. P. 183–192.
52. Almena-Aliste M., Mietton B. Cheese Classification, Characterization, and Categorization: A Global Perspective. *Microbiol. Spectr.* 2014. Vol. 2, № 1.
53. Almli V. L. et al. Consumers' acceptance of innovations in traditional cheese. A comparative study in France and Norway. *Appetite*. 2011. Vol. 57, № 1. P. 110–120.
54. Alonso R. et al. Proteolysis, lipolysis, volatile compounds and sensory characteristics of Hispánico cheeses made using frozen curd from raw and pasteurized ewe milk. *J. Dairy Res.* 2013. Vol. 80, № 1. P. 51–57.
55. Anema S. G., Kim Lee S., Klostermeyer H. Effect of pH at heat treatment on the hydrolysis of κ -casein and the gelation of skim milk by chymosin. *LWT - Food Sci. Technol.* 2007. Vol. 40, № 1. P. 99–106.

56. Ataci N. et al. Temperature and pH effect on milk clotting time of *mucor miehei* rennet. *Asian J. Chem.* 2009. Vol. 21, № 3. P. 1754–1758.
57. Ayyash M. M., Shah N. P. Proteolysis of low-moisture Mozzarella cheese as affected by substitution of NaCl with KCl. *J. Dairy Sci.* Elsevier, 2011. Vol. 94, № 8. P. 3769–3777.
58. Bachmann H. P. Cheese analogues: A review. *Int. Dairy J.* 2001. Vol. 11, № 4–7. P. 505–515.
59. Bakke A. J., Shehan C. V., Hayes J. E. Type of milk typically consumed, and stated preference, but not health consciousness affect revealed preferences for fat in milk. *Food Qual. Prefer.* Elsevier Ltd. 2016. Vol. 49. P. 92–99.
60. Banks J. M. Cheese yield: How is cheese yield defined? *Cheese Probl. Solved.* 2007. P. 102–104.
61. Bansal N. et al. Suitability of recombinant camel (*Camelus dromedarius*) chymosin as a coagulant for Cheddar cheese. *Int. Dairy J.* Elsevier Ltd, 2009. Vol. 19, № 9. P. 510–517.
62. Bansal N., Fox P. F., McSweeney P. L. H. Factors affecting the retention of rennet in cheese curd. *J. Agric. Food Chem.* 2007. Vol. 55, № 22. P. 9219–9225.
63. Barbara W. et al. Cheese in nutrition and health. *Dairy Sci. Technol.* 2008. Vol. 88. P. 389–405.
64. Barłowska J. et al. Nutritional value and technological suitability of milk from various animal species used for dairy production. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2011. Vol. 10, № 6. P. 291–302.
65. Barłowska J., Litwińczuk Z., Kowal M. Influence of production season and lactation stage on the technological suitability of milk from cows of various breeds fed in the TMR system. *Ann. Anim. Sci.* 2014. Vol. 14, № 3. P. 649–661.
66. Barouni E. et al. Immobilized rennin in TC/SG composite in cheese production. *Food Chem.* Elsevier Ltd. 2016. Vol. 200. P. 76–82.
67. Belletti N. et al. The size of native milk fat globules affects physico-chemical and sensory properties. *J. Food Prot.* 2009. Vol. 72, № 10. P. 2162–2169.

68. Ben Amira A. et al. Milk-clotting properties of plant rennets and their enzymatic, rheological, and sensory role in cheese making: A review. *Int. J. Food Prop.* 2017. Vol. 20, № 2. P. S76–S93.

69. Benamouzig, R., Tomé, D. Postprandial kinetics of dietary amino acids are the main determinant of their metabolism after soy or milk protein ingestion in humans. *The Journal of Nutrition.* № 133 (5), P. 1308-1315. doi.org/10.1093/jn/133.5.1308

70. Bezie A., Regasa H. The role of starter culture and enzymes. Rennet for fermented dairy products manufacture-A review. *Nutr. Food Sci.* 2019. Vol. 9, № 2. P. 21–27.

71. Bhattacharjee A.K. et al. Effect of pasteurization temperature on quality of aonla juice during storage. *J. Food Sci. Technol.* 2011. Vol. 48, № 3. P. 269–273.

72. Bila V., Merzlova H., Bilyi V., Merzlov S., Mashkin Y. Microbiological indicators of cottage cheese using different rennet leavens. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Food Technologies.* № 26(101). P. 3-7. <https://doi.org/10.32718/nvlvet-fl010>

73. Bila V.V., Bilyi V.Yu., Merzlova H.V., Merzlov S.V., Indicators of suluguni cheese when using enzyme preparations of different origin. *Сучасний розвиток технологій тваринництва. Інноваційні підходи у харчових технологіях: матеріали міжнародної науково-практичної конференції. (Білоцерківський НАУ 26 жовтня 2023 р.)* м. Біла Церква, 2023. С. 74-75.

74. Bilyi V., Merzlov S., Narizhnyy S., Mashkin Y., Merzlova G. (2021) Amino Acid Composition of Whey and Cottage Cheese Under Various Rennet Enzymes *Scientific Horizons.* 2021. Том 24, Випуск 9. С. 19 – 25. [https://doi.org/10.48077/scihor.24\(9\).2021.19-25](https://doi.org/10.48077/scihor.24(9).2021.19-25)

75. Bilyi, V. Y., & Merzlov, S. V. (2022). Effect of some current enzymes on milk coagulation indicators. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Agricultural sciences,* 24(96), 144–147. <https://doi.org/10.32718/nvlvet-a9620>

76. Birot S. et al. Food groups for allergen risk assessment: Combining food consumption data from different countries in Europe. *Food Chem. Toxicol.* Elsevier Ltd. 2018. Vol. 118. P. 371–381.
77. Blazic M. et al. The impact of traditional cheeses and whey on health. *Croat. J. Food Sci. Technol.* 2017. Vol. 9, № 2. P. 198–203.
78. Bönisch M. P., Heidebach T. C., Kulozik U. Influence of transglutaminase protein cross-linking on the rennet coagulation of casein. *Food Hydrocoll.* 2008. Vol. 22, № 2. P. 288–297.
79. Boris S. et al. Application of multiple factor analysis for the descriptive sensory evaluation and instrumental measurements of bryndza cheese as affected by vacuum packaging. *Int. J. Food Prop.* Taylor & Francis, 2018. Vol. 21, № 1. P. 1508–1522.
80. Borshch O. O., Borshch O. V., Kosior L. T., Lastovska I. A., Pirova L. V. The influence of crossbreeding on the protein composition, nutritional and energy value of cow milk. *Bulgarian Journal of Agricultural Science.* № 25(1). P. 117–123 doi:10.1016/j.jand.2016.09.025. ISSN 2212-2672. PMID 27886704.
81. Bragin L.A. et al. Regional aspects of the development of the cheese market in terms of the trend of healthy nutrition. *Entrep. Sustain. Issues.* 2019. Vol. 7, № 1. P. 626–636.
82. Britten M., Giroux H. J. Rennet coagulation of heated milk: A review. *Int. Dairy J.* Elsevier Ltd. 2022. Vol. 124. P. 105-179.
83. Busani L. et al. Antimicrobial susceptibility of vancomycin-susceptible and -resistant enterococci isolated in Italy from raw meat products, farm animals, and human infections. *International J. Food Microbiol.* 2004. № 97. P. 17–22. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.04.008
84. Çakmakçı S., Borolu E. Some quality characteristics of commercial liquid rennet samples. *Turkish J. Vet. Anim. Sci.* 2004. Vol. 28, № 3. P. 501–505.
85. Çep F., Akın M. B. G.-. Effects of coagulating enzyme types (commercial calf rennet, *Aspergillus niger* var. *awamori* as recombinant chymosin and *rhizomucor miehei* as microbial rennet) on the chemical and sensory

characteristics of white pickled cheese. *African J. Biotechnol.* 2013. Vol. 12, № 37. P. 5588–5594.

86. Chaudhary S., Sagar S. The use of enzymes in food processing: A review. *South Asian J. Food Technol. Environ.* 2015. Vol. 01, № 3-4. P. 190–210.

87. Cilliers F.P. et al. A microbiological, biochemical and sensory characterisation of bovine milk treated by heat and ultraviolet (UV) light for manufacturing Cheddar cheese. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* Elsevier Ltd. 2014. Vol. 23. P. 94–106.

88. Čítek J. et al. Technological properties of cow's milk: correlations with milk composition, effect of interactions of genes and other factors. *Czech J. Anim. Sci.* 2020. Vol. 65, № 1. P. 13–22.

89. Claeys W. L. et al. Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits. *Food Control.* Elsevier Ltd. 2013. Vol. 31, № 1. P. 251–262.

90. Corredig M., Salvatore E. Enzymatic coagulation of milk. *Adv. Dairy Chem.* Vol. 1B Proteins Appl. Asp. Fourth Ed. 2016. Vol. 1. P. 287–307.

91. Costa A. et al. Invited review: Milk lactose—Current status and future challenges in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* American Dairy Science Association, 2019. Vol. 102, № 7. P. 5883–5898.

92. Day L. et al. Casein polymorphism heterogeneity influences casein micelle size in milk of individual cows. *J. Dairy Sci.* American Dairy Science Association, 2015. Vol. 98, № 6. P. 3633–3644.

93. Desobry-Banon S., Richard F., Hardy J. Study of acid and rennet coagulation of high pressurized milk. *J. Dairy Sci.* Elsevier. 1994. Vol. 77, № 11. P. 3267–3274.

94. Edrington T.S. et al. Development of colonic microflora as assessed by pyrosequencing in dairy calves fed waste milk. *J. Dairy Sci.* Elsevier. 2012. Vol. 95, № 8. P. 4519–4525.

95. Eisenmenger M. J., Reyes-De-Corcuera J.I. High pressure enhancement of enzymes: A review. *Enzyme Microb. Technol.* 2009. Vol. 45, № 5. P. 331–347.

96. El-Agamy E. I. The challenge of cow milk protein allergy. *Small Rumin. Res.* 2007. Vol. 68, № 1–2. P. 64–72.
97. El-gawad M. A., Ahmed N. S. Cheese yield as affected by some parameters review Mona A. M. Abd El-Gawad, Nawal S. Ahmed. 2011. Vol. 10, № 2. P. 131–153.
98. El-Hawary M. et al. Optimization of utilization of calf rennet and adult bovine rennet mixtures in domiati cheese making. *J. Food Dairy Sci.* 2012. Vol. 3, № 9. P. 473–479.
99. Ellman G.L. Tissue sulfhydryl groups / G.L. Ellman // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1959. – Vol. 82, № 1. – P. 70–77.
100. Esawy M. A., Combet-Blanc Y. Immobilization of *Bacillus licheniformis* 5A1 milk-clotting enzyme and characterization of its enzyme properties. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2006. Vol. 22, № 3. P. 197–200.
101. Filkin S. Y. et al. Optimization of the production Method for Recombinant Chymosin in the Methylophilic Yeast *Komagataella phaffii*. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2020. Vol. 56, № 6. P. 657–661.
102. Foltmann B. Chymosin: A short review on foetal and neonatal gastric proteases. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1992. Vol. 52. P. 65–79.
103. Fox P. F. et al. *Fundamentals of Cheese Science*. Fundamentals of Cheese Science, Second Edition. Boston, MA: Springer US, 2017. P. 1–799.
104. Fox P.F. et al. *Fundamentals of cheese science, second edition*. Fundamentals of Cheese Science, Second Edition. 2016. № 1. P. 1–799.
105. Gamlath C. J. et al. The inhibitory roles of native whey protein on the rennet gelation of bovine milk. *Food Chem. Elsevier*, 2018. Vol. 244, № 8. P. 36–43.
106. García V. et al. Improvements in goat milk quality: A review. *Small Rumin. Res. Elsevier B.V.* 2014. Vol. 121, № 1. P. 51–57.
107. García-Gómez B. et al. Rennet type and microbial transglutaminase in cheese: effect on sensory properties. *Eur. Food Res. Technol.* Springer Berlin Heidelberg. 2020. Vol. 246, № 3. P. 513–526.

108. Génie L. De, Pascal C. B., Landais A. Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. *Food technol. biotechnol.* 2006. Vol. 44, № 2. P. 211–220.
109. Getaneh G., Mebrat A, Wubie A and Kendie H. Review on Goat Milk Composition and its Nutritive Value. *J. Nutr. Heal. Sci.* 2016. Vol. 3, № 4.
110. Gonzales-Barron U. et al. Foodborne pathogens in raw milk and cheese of sheep and goat origin: a meta-analysis approach. *Curr. Opin. Food Sci.* Elsevier Ltd. 2017. Vol. 18. P. 7–13.
111. Guarino C. et al. Peptidomic approach, based on liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry, for detecting sheep's milk in goat's and cow's cheeses. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2010. Vol. 24, № 6. P. 705–713.
112. Guinee T. P., O'Brien B., Mulholland E. O. The suitability of milk from a spring-calved dairy herd during the transition from normal to very late lactation for the manufacture of low-moisture Mozzarella cheese. *Int. Dairy J.* 2007. Vol. 17, № 2. P. 133–142.
113. Guinee T.P. et al. Effect of diet quality on the suitability of mid-lactation bovine milk for cheddar cheese manufacture. *Aust. J. Dairy Technol.* 2001. Vol. 56, № 1. P. 3.
114. Hachak Y., Gutyj B., Bilyk O., Nagovska V., Mykhaylytska O. Effect of the cryopowder amaranth on the technology of molten cheese. *Eastern-European journal of enterprise technologies.* 2018. №1 (11). P. 10-15.
115. Harboe M., Broe M. L., Qvist K. B. The production, action and application of rennet and coagulants. *Technology of cheesemaking: Second Edition.* 2010. P. 98–129.
116. Hayaloglu A. A., Farkye N. Y. Cheese with added herbs, spices and condiments. *Encyclopedia of dairy sciences.* Elsevier, 2011. P. 783–789.
117. Hayaloglu A. A., Karatekin B., Gurkan H. Thermal stability of chymosin or microbial coagulant in the manufacture of Malatya, a Halloumi type cheese:

Proteolysis, microstructure and functional properties. *Int. Dairy J.* Elsevier Ltd. 2014. Vol. 38, № 2. P. 136–144.

118. Hayaloglu A. A., Ozer B. H., Fox P. F. Cheeses of Turkey: 2. Varieties ripened under brine. *Dairy sci. Technol.* 2008. Vol. 88, № 2. P. 225–244.

119. Heidebach T., Först P., Kulozik U. Microencapsulation of probiotic cells by means of rennet-gelation of milk proteins. *Food Hydrocoll.* 2009. Vol. 23, № 7. P. 1670–1677.

120. Hesari J. et al. Contribution of rennet and starter to proteolysis in Iranian UF white cheese. *Lait.* 2006. Vol. 86, № 4. P. 291–302.

121. Hosseini S., Varidi M. Optimization of microbial rennet encapsulation in alginate – chitosan nanoparticles. *Food Chem.* Elsevier Ltd. 2021. Vol. 352, № 2. P. 129–325.

122. Hulin-Bertaud S. et al. Sensory and compositional relationships between commercial Cheddar-flavored enzyme-modified cheeses and natural Cheddar. *J. Food Sci.* 2000. Vol. 65, № 6. P. 1076–1082.

123. Hwang E. T., Gu M. B. Enzyme stabilization by nano/microsized hybrid materials. *Eng. Life Sci.* 2013. Vol. 13, № 1. P. 49–61.

124. Inmaculada González-Martín M. et al. Discrimination between cheeses made from cow's, ewe's and goat's milk from unsaturated fatty acids and use of the canonical biplot method. *J. Food Compos. Anal.* Elsevier Inc. 2017. Vol. 56. P. 34–40.

125. *International Journal of Food Microbiology.* 2007. Vol. 116, № 1. P. 126–135. ISSN 0168-1605. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.12.024>.

126. Irigoyen A. et al. Evaluation of the effect of rennet type on casein proteolysis in an ovine milk cheese by means of capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A.* 2000. Vol. 881, № 1–2. P. 59–67.

127. Irigoyen A. et al. Influence of calf or lamb rennet on the physicochemical, proteolytic, and sensory characteristics of an ewe's-milk cheese. *Int. Dairy J.* 2002. Vol. 12, № 1. P. 27–34.

128. Iyer P. V., Ananthanarayan L. Enzyme stability and stabilization- Aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochem.* 2008. Vol. 43, № 10. P. 1019–1032.
129. Jacob M., Jaros D., Rohm H. Recent advances in milk clotting enzymes. *Int. J. Dairy Technol.* 2011. Vol. 64, № 1. P. 14–33.
130. Jensen J. L., Mølgaard A., Poulsen J. N. Camel and bovine chymosin : the relationship between their structures and cheese making properties supplementary Material. *Suppl. Camel Bov. Chymosin.* 2013. Vol. 69, № 5. P. 901–913.
131. Johnson M. E. A 100-Year Review: Cheese production and quality. *J. Dairy Sci. American Dairy Science Association*, 2017. Vol. 100, № 12. P. 9952–9965.
132. Jõudu I. et al. The effect of milk protein contents on the rennet coagulation properties of milk from individual dairy cow. *Int. Dairy J.* 2008. Vol. 18, № 9. P. 964–967.
133. Journals, I. O. S. R. Optimization of Fungal Rennet Production by local isolate of *Rhizomucor nainitalensis* Under Solid Substrate Fermentation system. *Pharm. Biol. Sci.* 2013. Vol. 5, № 2. P. 115–121.
134. Kamimura B. A. et al. Brazilian artisanal cheeses: an overview of their characteristics, main types and regulatory aspects. *Compr. rev. Food Sci. Food Saf.* 2019. Vol. 18, № 5. P. 1636–1657.
135. Kapoor R., Metzger L. E. Process cheese: Scientific and technological aspects - A review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2008. Vol. 7, № 2. P. 194–214.
136. Kappeler S. R. et al. Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006. Vol. 342, № 2. P. 647–654.
137. Kaur N. et al. Recent developments in purification techniques and industrial applications for whey valorization: A review. *Chem. Eng. Commun. Taylor Francis.* 2020. Vol. 207, № 1. P. 123–138.
138. Kaylegian K. E., Caprera L. Cheese Tracking System. 2017. 35 p.

139. Kelly A. L., O'Flaherty F., Fox P. F. Indigenous proteolytic enzymes in milk: A brief overview of the present state of knowledge. *Int. Dairy J.* 2006. Vol. 16, № 6. P. 563–572.
140. Kethireddipalli P., Hill A. R., Dalgleish D. G. Protein interactions in heat-treated milk and effect on rennet coagulation. *Int. Dairy J.* Elsevier Ltd. 2010. Vol. 20, № 12. P. 838–843.
141. Khattab A. R. et al. Cheese ripening: A review on modern technologies towards flavor enhancement, process acceleration and improved quality assessment . *Trends Food Sci. Technol.* 2019. Vol. 88, № January. P. 343–360.
142. Kholodenko, I. V., Bila, V. V., Bilyi, V. Yu., & Mashkin, Y. O. (2023). Sensory indicators of suluguni cheese when using enzyme preparations of different origins in the technology of soft cheeses. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Food Technologies*, 25(99), 104–107. <https://doi.org/10.32718/nvlvet-f9918>
143. Kieliszek M., Misiewicz A. Microbial transglutaminase and its application in the food industry. A review. *Folia Microbiol.* 2014. Vol. 59, № 3. P. 241–250.
144. Kilcawley K. N. et al. Factors influencing the flavour of bovine milk and cheese from grass based versus non-grass based milk production systems. *Foods.* 2018. Vol. 7, № 3.
145. Kilcawley K. N., Wilkinson M. G., Fox P. F. Review: Enzyme-modified cheese. *Int. Dairy J.* 1998. Vol. 8, № 1. P. 1–10.
146. Kim J., Grate J. W., Wang P. Nanostructures for enzyme stabilization. *Chem. Eng. Sci.* 2006. Vol. 61, № 3. P. 1017–1026.
147. Kind P. R.N. Estimation of plasma phosphatase by determination of hydrolysed phenol with aminoantipyrine / P.R.N. Kind, E.J. King // *J. Clin. Pathol.* – 1954. – Vol. 7. – P. 322–326.
148. Kislyakova E. et al. Influence of using seeds of fl ax and raps in cow rates on the quality of milk and dairy products. *Bulg. J. Agric. Sci.* 2019. Vol. 25, № 1. P. 129–133.

149. Kulozik U. Cheese Technology. Int. J. Dairy Technol. 2010. Vol. 63, № 2. P. 303–303.
150. Kumar A. et al. Chymosin and other milk coagulants: Sources and biotechnological interventions. Crit. Rev. Biotechnol. 2010. Vol. 30, № 4. P. 243–258.
151. Kumar A. et al. Purification and characterization of milk clotting enzyme from goat (*Capra hircus*). Comp. biochem. physiol. B biochem. mol. biol. 2006. Vol. 145, № 1. P. 108–113.
152. Kushnir I. I., Tsisaryk O. Y., Kushnir I. M., Semen I. S., Slyvka I. M., Musiy L. Y. Properties of formed compositions of probiotic strains isolated from Carpathian bryndza. Scientific messenger of Lviv national university of veterinary medicine and biotechnologies. Series: Agricultural sciences. 2020. Vol. 22(93). P. 119–125. doi: 10.32718/nvlvet-a9320
153. Kushnir I. I., Tsisaryk O. Y., Slyvka I. M., Musiy L. Y., Kushnir I. M., Semen I. S. Growth intensity and antibacterial properties of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans* strains isolated from traditional Carpathian brynza. Scientific messenger of Lviv national university of veterinary medicine and biotechnologies. Series: Agricultural sciences. 2020. Vol. 22(92). P. 42–49. doi: 10.32718/nvlvet-a9208
154. Lambré C. et al. Safety evaluation of the food enzyme containing chymosin and pepsin from the abomasum of calves and cows. EFSA J. 2021. Vol. 19, № 6. P. 1–9.
155. Larsen L.B. et al. Bovine milk procathepsin D: Presence and activity in heated milk and in extracts of rennet-free UF-Feta cheese. Int. Dairy J. 2000. Vol. 10, № 1–2. P. 67–73.
156. Lauzin A. et al. Effect of pH adjustment on the composition and rennet-gelation properties of milk concentrates made from ultrafiltration and reverse osmosis. J. Dairy Sci. American Dairy Science Association. 2019. Vol. 102, № 5. P. 3939–3946.

157. Lavoie K. et al. Characterization of the fungal microflora in raw milk and specialty cheeses of the province of Quebec. *Dairy Sci. Technol.* 2012. Vol. 92, № 5. P. 455–468.
158. Leite B. R. D. C. et al. Characterization of rennet-induced gels using calf rennet processed by high pressure homogenization: Effects on proteolysis, whey separation, rheological properties and microstructure. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* Elsevier Ltd. 2014. Vol. 26. P. 517–524.
159. Leitner G. et al. Interactions between bacteria type, proteolysis of casein and physico-chemical properties of bovine milk. *Int. Dairy J.* 2006. Vol. 16, № 6. P. 648–654.
160. Lemes A. C. et al. A new milk-clotting enzyme produced by *Bacillus* sp. P45 applied in cream cheese development. *LWT - Food Sci. Technol.* Elsevier Ltd. 2016. Vol. 66. P. 217–224.
161. Li Q., Zhao Z. Acid and rennet-induced coagulation behavior of casein micelles with modified structure. *Food Chem.* Elsevier. 2019. Vol. 291, № 4. P. 231–238.
162. Li Z. et al. Effect of temperature and pH on the properties of skim milk gels made from a tamarillo (*Cyphomandra betacea*) coagulant and rennet. *J. Dairy Sci.* 2018. Vol. 101, № 6. P. 4869–4878.
163. Little C. L. et al. Microbiological quality of retail cheeses made from raw, thermized or pasteurized milk in the UK. *Food Microbiol.* 2008. Vol. 25, № 2. P. 304–312.
164. Litwińczuk Z. et al. Nutritional value and technological suitability of milk from cows of three polish breeds included in the genetic resources conservation programme. *Ann. Anim. Sci.* 2012. Vol. 12, № 3. P. 423–432.
165. Lock A. L., Bauman D.E. Modifying milk fat composition of dairy cows to enhance fatty acids beneficial to human health. *Lipids.* 2004. Vol. 39, № 12. P. 1197–1206.
166. López-Calleja I. et al. PCR detection of cows' milk in water buffalo milk and mozzarella cheese. *Int. Dairy J.* 2005. Vol. 15, № 11. P. 1122–1129.

167. Lowry O.H. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.H. Lowry, N. I. Rosenbrough, A.L. Farr // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193. – P. 265–315.
168. Mamo A., Balasubramanian N. Calf rennet production and its performance optimization. J. Appl. Nat. Sci. 2018. Vol. 10, № 1. P. 247–252.
169. Mamo J., Assefa F. The role of microbial aspartic protease enzyme in food and Beverage Industries. J. Food Qual. 2018. Vol. 2018.
170. Mantaounis D., Pitts J. Protein engineering of chymosin; modification of the optimum pH of enzyme catalysis. Protein Eng. Des. Sel. 1990. Vol. 3, № 7. P. 605–609.
171. Marcinkoniene L., Ciprovica I. The influence of milk quality and composition on goat milk suitability for cheese production. Agron. Res. 2020. Vol. 18, № Special Issue 3. P. 1796–1703.
172. Marques D. et al. Protein hydrolysis by immobilized and stabilized trypsin. Biotechnol. Prog. 2011. Vol. 27, № 3. P. 677–683.
173. McLellan J. A Brief History of Cambodians. Cambodian Refugees in Ontario. University of Toronto Press. 1998. P. 1–8.
174. McSweeney P. L. H., Ottogalli G., Fox P. F. Diversity and classification of cheese varieties: an overview. Cheese. Fourth edi. Elsevier. 2017. Vol. 8, № 9. P. 781–808.
175. Mehta P. K., Sehgal S. Microbial enzymes in food processing. Biocatal. Enzym. Basics Appl. 2019. P. 255–275.
176. Mende S., Jaros D., Rohm H. Dextran modulates physical properties of rennet-induced milk gels. Int. J. Food Sci. Technol. 2020. Vol. 55, № 4. P. 1407–1415.
177. Merzlov S., Bilyi V., Rindin A (2019) The effect of extractors on indicators of elimination of exposed enzymes. Scientific Horizons. 2019. Випуск 8. С. 77 – 81. <https://doi.org/10.33249/2663-2144-2019-81-8-77-81>
178. Mir Khan U., Selamoglu Z. Use of enzymes in dairy industry: A review of current progress. Arch. Razi Inst. 2020. Vol. 75, № 1. P. 131–136.

179. Mohamed Ahmed I. A., Babiker E. E., Mori N. pH stability and influence of salts on activity of a milk-clotting enzyme from *Solanum dubium* seeds and its enzymatic action on bovine caseins. *LWT - Food Sci. Technol.* Elsevier Ltd. 2010. Vol. 43, № 5. P. 759–764.
180. Møller K. K. et al. Comparison of the hydrolysis of bovine κ -casein by camel and bovine chymosin: A kinetic and specificity study. *J. Agric. Food Chem.* 2012. Vol. 60, № 21. P. 5454–5460.
181. Moradi M. et al. The relationship between milk somatic cell count and cheese production, quality and safety: A review. *Int. Dairy J.* Elsevier Ltd. 2021. Vol. 113. P. 104-884.
182. Moschopoulou E. Characteristics of rennet and other enzymes from small ruminants used in cheese production. *Small Rumin. Res.* Elsevier B.V. 2011. Vol. 101, № 1–3. P. 188–195.
183. Moschopoulou E. E. et al. Purification and characterization of chymosin and pepsin from kid. *J. Dairy Res.* 2006. Vol. 73, № 1. P. 49–57.
184. Mótyán J., Tóth F., Tózsér J. Research applications of proteolytic enzymes in molecular biology. *Biomolecules.* 2013. Vol. 3, № 4. P. 923–942.
185. Myagkonosov D. S. et al. Express method for assessing proteolysis in cheese and aromatic additives with cheese flavor. *Food Syst.* 2021. Vol. 3, № 4. P. 4–10.
186. Nagovska V., Hachak Y., Gutyj B., Bilyk O., Slyvka N. Influence of milk thistle shot on quality parameters of the sour-milk beverage. *EUREKA: Life Sciences.* 2018. Vol.4. P. 3-12.
187. Narizhnyy S., Bilyi V., Rudakova T., Minorova A., Vezhlytseva S. Formation of the structure of low-calorie ice cream with vegetable ingredients. «Animal Husbandry Products Production and Processing», 2023. № 1. PP. 124–131. <https://doi.org/10.33245/2310-9289-2023-178-1-124-131>
188. O'Brien N. M., O'Connor T. P. Nutritional aspects of cheese. *Cheese: chemistry, physics and microbiology: Fourth Ed.* Elsevier Ltd. 2017. Vol. 1. P. 603–611.

189. O'Connell J. E. et al. Influence of ethanol on the rennet-induced coagulation of milk. *J. Dairy Res.* 2006. Vol. 73, № 3. P. 312–317.
190. O'Loughlin I. B. et al. Enzymatic hydrolysis of heat-induced aggregates of whey protein isolate. *J. Agric. Food Chem.* 2012. Vol. 60, № 19. P. 4895–4904.
191. Ozrenk E., Inci S.S. The effect of seasonal variation on the composition of cow milk in Van Province. *Pakistan J. Nutr.* 2008. Vol. 7, № 1. P. 161–164.
192. Pal S. et al. Milk intolerance, beta-casein and lactose. *Nutrients.* 2015. Vol. 7, № 9. P. 7285–7297.
193. Panagopoulou M. A. et al. Impedimetric biosensor for the assessment of the clotting activity of rennet. *Anal. Chem.* 2010. Vol. 82, № 20. P. 8629–8636.
194. Pandya A. J., Ghodke K. M. Goat and sheep milk products other than cheeses and yoghurt. *Small Rumin. Res.* 2007. Vol. 68, № 1–2. P. 193–206.
195. Park Y. Goat milk: composition, characteristics. *Encycl anim. Sci.* 2010. № 6.
196. Park Y. W., Jeanjulien C., Siddique A. Factors affecting sensory quality of goat milk cheeses: a review. *Adv. Dairy Res.* 2017. Vol. 05, № 03. doi:10.4172/2329-888X.1000185
197. Pereira C. I. et al. Proteolysis in model Portuguese cheeses: Effects of rennet and starter culture. *Food chem.* 2008. Vol. 108, № 3. P. 862–868.
198. Pessela B. C. C. et al. Immobilization of rennet from *Mucor miehei* via its sugar chain. Its use in milk coagulation. *Biomacromolecules.* 2004. Vol. 5, № 5. P. 2029–2033.
199. Pino A. et al. Proteolysis during the ripening of goats' milk cheese made with plant coagulant or calf rennet. *Food res. Int. Elsevier Ltd.* 2009. Vol. 42, № 3. P. 324–330.
200. Putranto W. S. et al. The purification of rennin-like protease from *Lactobacillus Paracasei*, isolated from Ettawa goat milk. *Ann. Bogor.* 2021. Vol. 24, № 2. P. 74.

201. Pyanikova E. A., Kovaleva A. E., Galchenko S. I. The use of marketing instrumentarium to ensure a balanced healthy diet of young students. Proc. Int. sci. conf. "Far East Con" (ISCFEC 2020). 2020. Vol. 128, № Iscfec. P. 406–415.
202. Rampilli M., Larsen R., Harboe M. Natural heterogeneity of chymosin and pepsin in extracts of bovine stomachs. Int. Dairy J. 2005. Vol. 15, № 11. P. 1130–1137.
203. Raynal-Ljutovac K. et al. Composition of goat and sheep milk products: An update. Small Rumin. Res. 2008. Vol. 79, № 1. P. 57–72.
204. Reitman S., A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases / S. Reitman, S. Frankel // Amer. J. Clin. Pthol. – 1957. – Vol. 28. – P. 56.
205. Renan M. et al. Limited enzymatic treatment of skim milk using chymosin affects the micelle/serum distribution of the heat-induced whey protein/ κ -casein aggregates. J. Agric. Food Chem. 2007. Vol. 55, № 16. P. 6736–6745.
206. Renault C. et al. Effect of temperature of milk acidification on rennet gel properties. J. Food Sci. 2000. Vol. 65, № 4. P. 630–634.
207. Reps A. et al. Influence of high pressures on commercial milk clotting preparations. High Press. Res. 2000. Vol. 19, № 1–6. P. 49–54.
208. Ricca E., Brucher B., Schrittwieser J. H. Multi-enzymatic cascade reactions: Overview and perspectives. Adv. Synth. Catal. 2011. Vol. 353, № 13. P. 2239–2262.
209. Roa I., Belén López M., Javier Mendiola F. Residual clotting activity and ripening properties of vegetable rennet from *Cynara cardunculus* in La Serena cheese. Food Res. Int. 1999. Vol. 32, № 6. P. 413–419.
210. Rodrigues R.C., Berenguer-Murcia Á., Fernandez-Lafuente R. Coupling chemical modification and immobilization to improve the catalytic performance of enzymes. Adv. Synth. Catal. 2011. Vol. 353, № 13. P. 2216–2238.
211. Rogelj I. et al. Recombinant lamb chymosin as an alternative coagulating enzyme in cheese production. J. Dairy Sci. 2001. Vol. 84, № 5. P. 1020–1026.

212. Rossano R., Larocca M., Riccio P. Digestive enzymes of the crustaceans *Munida* and their application in cheese manufacturing: A review. *Mar. Drugs*. 2011. Vol. 9, № 7. P. 1220–1231.
213. Saliha B. H. et al. Comparative study of milk clotting activity of crude gastric enzymes extracted from camels' abomasum at different ages and commercial enzymes (rennet and pepsin) on bovine and camel milk. *Emirates J. Food Agric*. 2011. Vol. 23, № 4. P. 301–310.
214. Sandra S., Alexander M., Dalglish D. G. The rennet coagulation mechanism of skim milk as observed by transmission diffusing wave spectroscopy. *J. Colloid Interface Sci*. 2007. Vol. 308, № 2. P. 364–373.
215. Sant'Ana A. M. S. et al. Fatty acid, volatile and sensory profiles of milk and cheese from goats raised on native semiarid pasture or in confinement. *Int. Dairy J. Elsevier Ltd*. 2019. Vol. 91. P. 147–154.
216. Santillo A., F. D'Angelo, M. Caroprese, R. Marino & M. Albenzio. Influence of diet and of lamb slaughtering age on the coagulating properties of rennet paste. *Italian Journal of Animal Science/ Vol. 4*, 2005.
217. Saubusse M., Millet L., Delbes C., Callon C., Montel M. C. Application of Single Strand Conformation Polymorphism — PCR method for distinguishing cheese bacterial communities that inhibit *Listeria monocytogenes*. *International journal of food microbiology*. Vol. 116, № 1. P. 126-135.
218. Semjon B. et al. Sensory profile of parenica cheese varieties made from pasteurized cow's milk. *Potravin. Slovak J. Food Sci*. 2019. Vol. 13, № 1. P. 76–82.
219. Shah M. A., Mir S. A., Paray M. A. Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: A review. *Dairy Sci. Technol*. 2014. Vol. 94, № 1. P. 5–16.
220. Shakeel-ur-rehman et al. Alternatives to pilot plant experiments in cheese-ripening studies. *Int. J. Dairy Technol*. 2001. Vol. 54, № 4. P. 121–126.
221. Shieh C. J., Phan Thi L. A., Shih I. L. Milk-clotting enzymes produced by culture of *Bacillus subtilis natto*. *Biochem. Eng. J*. 2009. Vol. 43, № 1. P. 85–91.

222. Silva C. et al. Practical insights on enzyme stabilization. *Crit. Rev. Biotechnol. Informa Healthcare USA. Inc.* 2018. Vol. 38, № 3. P. 335–350.
223. Silva S. V. et al. Comparative studies on the gelling properties of cardosins extracted from *Cynara cardunculus* and chymosin on cow's skim milk. *Int. Dairy J.* 2003. Vol. 13, № 7. P. 559–564.
224. Silveira G. G. da et al. Microbial rennet produced by *Mucor miehei* in solid-state and submerged fermentation. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 2005. Vol. 48, № 6. P. 931–937.
225. Singh R., Singh A., Sachan S. Enzymes used in the food industry: friends or foes? *Enzymes in food biotechnology: production, applications, and future prospects.* Elsevier Inc. 2018. P. 827–843 p.
226. Skeie S.B. Quality aspects of goat milk for cheese production in Norway: A review. *Small Rumin. Res. Elsevier B.V.* 2014. Vol. 122, № 1–3. P. 10–17.
227. Skulska I. V., Tsisaryk O. Y. Vplyv chastkovoї zaminy khlorydu natriiu na proteoliz pry vyrobnytstvi brynzy. *Skhidno-Yevropeyskyi zhurnal peredovykh tekhnolohii.* 2014. Vol. 5/11(71). P. 126 (in Ukrainian).
228. Smith S., Smith T. J., Drake M. A. Short communication: Flavor and flavor stability of cheese, rennet, and acid wheys. *J. Dairy Sci. Elsevier.* 2016. Vol. 99, № 5. P. 3434–3444.
229. Smykov I. Determination of the moment of readiness of milk coolant for cutting in cheese production. *Food systems.* 2018. Vol. 1, № 2. P. 12–20.
230. Smykov I. T. Nanotechnology in the dairy industry: Benefits and risks. *ELSI Handb. Nanotechnol. Risk, Safety, ELSI Commer.* 2020. P. 223–275.
231. Soltani M. et al. Effect of blends of camel chymosin and microbial rennet (*Rhizomucor miehei*) on chemical composition, proteolysis and residual coagulant activity in Iranian Ultrafiltered White cheese. *J. Food Sci. Technol. Springer India.* 2019. Vol. 56, № 2. P. 589–598.

232. Soodam K. et al. Effect of rennet on the composition, proteolysis and microstructure of reduced-fat Cheddar cheese during ripening. *Dairy Sci. Technol.* 2015. Vol. 95, № 5. P. 665–686.
233. Spinnler H. E. Surface mold-ripened cheeses. *Cheese: chemistry, physics and microbiology: Fourth edition.* Elsevier Ltd. 2017. Vol. 1. P. 911–928 p.
234. Starovoitova V. V. et al. A comparative study of functional properties of calf chymosin and its recombinant forms. *Biochem.* 2006. Vol. 71, № 3. P. 320–324.
235. St-Gelais D., Haché S. Effect of β -casein concentration in cheese milk on rennet coagulation properties, cheese composition and cheese ripening. *Food Res. Int.* 2005. Vol. 38, № 5. P. 523–531.
236. Tadjine D. et al. Pasteurization effects on yield and physicochemical parameters of cheese in cow and goat milk. *Food Sci. Technol.* 2020. Vol. 40, № 3. P. 580–587.
237. Taheri-Kafrani A. et al. Recent developments in enzyme immobilization technology for high-throughput processing in food industries. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* Taylor & Francis. 2021. Vol. 61, № 19. P. 3160–3196.
238. Tejada L. et al. Proteolysis in goats' milk cheese made with calf rennet and plant coagulant. *Int. Dairy J.* 2008. Vol. 18, № 2. P. 139–146.
239. Tesfaw A. T. Extraction , partial purification and characterization of milk- clotting enzyme from local coagulants on the yield of cheese using cow milk. *Res. Sq.* 2021. P. 1–9.
240. Thill S. et al. A regenerated fiber from rennet-treated casein micelles. *Colloid Polym. Sci. Colloid and Polymer Science.* 2021. Vol. 299, № 5. P. 909–914.
241. Tilocca B. et al. Milk microbiota: Characterization methods and role in cheese production. *J. Proteomics.* Elsevier B.V. 2020. Vol. 210. P. 103-534.
242. Tito F. R. et al. Determination and characterisation of milk-clotting activity of two *Solanum tuberosum* aspartic proteases (StAPs). *Int. Dairy J.* Elsevier Ltd. 2020. Vol. 104. P. 104-645.

243. Tociu M., Todasca M. C., Stanescu M. D. Authentication and nutritional benefits of cheeses based on vegetable oils. *Rev. Chim.* 2017. Vol. 68, № 9. P. 2002–2005.
244. Topnikova E. V. et al. Study of fatty acid composition of milk for cheese production. *Food syst.* 2019. Vol. 2, № 4. P. 34–37.
245. Tsioulpas A., Lewis M.J., Grandison A. S. Effect of minerals on casein micelle stability of cows' milk. *J. Dairy Res.* 2007. Vol. 74, № 2. P. 167–173.
246. Tuinier R., De Kruif C. G. Stability of casein micelles in milk. *J. Chem. Phys.* 2002. Vol. 117, № 3. P. 1290–1295.
247. Uniacke-Lowe T., Fox P. F. Chymosin, pepsins and other aspartyl proteinases: structures, functions, catalytic mechanism and milk-clotting properties. *Cheese: chemistry, physics and microbiology: Fourth Edi.* Elsevier Ltd. 2017. Vol. 1, № 1986. P. 69–113.
248. Vallejo J. A. et al. Short communication: A comparative analysis of recombinant chymosins. *J. Dairy Sci.* Elsevier. 2012. Vol. 95, № 2. P. 609–613.
249. Van Dyk J. S., Pletschke B. I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes-Factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnol. Adv.* Elsevier Inc. 2012. Vol. 30, № 6. P. 1458–1480.
250. Van Kampen V. et al. Berufliche Allergien gegen Pepsin, Chymosin und mikrobielle Labersatzstoffe 1. *Pneumologie.* 2013. Vol. 67, № 5. P. 260–264.
251. Vishwanatha K. S., Appu Rao A. G., Singh S. A. Production and characterization of a milk-clotting enzyme from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010. Vol. 85, № 6. P. 1849–1859.
252. Wang Y. et al. Purification and partial characterization of milk-clotting enzyme extracted from glutinous rice wine mash liquor. *Korean J. Chem. Eng.* 2009. Vol. 26, № 5. P. 1313–1318.
253. Watts S. A mini review on technique of milk pasteurization. *J. Pharmacogn. Phytochem.* 2016. Vol. 5, № 5. P. 99–101.

254. West H. G. Food fears and raw-milk cheese. *Appetite*. 2008. Vol. 51, № 1. P. 25–29.
255. Whitehurst R. J., Wiley A. J. *Enzymes in food technology* second edition wiley blackwell 2009. Food technology. 2009. 387 p.
256. Wolanciuk A. et al. Suitability of the milk of native breeds of cows from low-input farms for cheese production, including rennet curd texture. *Int. J. Dairy Technol.* 2016. Vol. 69, № 4. P. 585–591.
257. Wouters J. T. M. et al. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *Int. Dairy J.* 2002. Vol. 12. № September 2001. P. 91–109.
258. Yerlikaya O. Starter cultures used in probiotic dairy product preparation and popular probiotic dairy drinks. *Food Sci. Technol.* 2014. Vol. 34, № 2. P. 221–229.
259. Yoon Y., Lee S., Choi K. H. Microbial benefits and risks of raw milk cheese. *Food Control*. Elsevier Ltd. 2016. Vol. 63. P. 201–215.
260. Zhao Y. et al. Improved gel properties of whey protein-stabilized emulsions by ultrasound and enzymatic cross-linking. *Gels*. 2021. Vol. 7, № 3.
261. Zobrist M.R. et al. High-pressure-induced changes in the rennet coagulation properties of bovine milk. *Int. Dairy J.* 2005. Vol. 15, № 6–9. P. 655–662.

Додаток А

ЗАТВЕРДЖУЮ

Директор
ТОВ «Земля Томилівська»

С.П. Вахний

22 липня 2025 р.

Акт

**впровадження результатів науково-дослідних,
дослідно-конструкторських та технологічних робіт**

Підприємство де здійснюється впровадження:

ТОВ «Земля Томилівська», Білоцерківський район, Київська область.

Вид впроваджувальних результатів: використання іммобілізованих сичужних ензимів для виробництва м'яких сирів.

Автор наукової роботи: аспірант кафедри харчових технологій та технології переробки продукції тваринництва Білий В.Ю.

Практичні рекомендації: для вирішення проблеми виробництва м'яких сичужних сирів було запропоновано використання іммобілізованих сичужних ензимів.

Характер масштабів впровадження: дослідження були проведені у цеху молочної переробки потужністю 1100 кг молочної сировини на добу.

Новизна результатів досліджень: застосовуються нові біотехнологічні підходи, щодо способів екстракції та стабілізації сичужних ензимів та їх використання за технології м'яких сирів.

Було встановлено, що період сквашування молока як за використання іммобілізованих так і нативних сичужних ензимів був однаковим, що не викликало додаткових витрат енергоносіїв на підтримання необхідної температури.

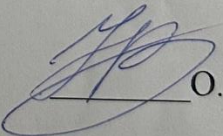
Економічні показники іммобілізованих сичужних ензимів в умовах молочного цеху ТОВ «Земля Томилівська»

Продовження додатка А

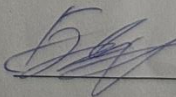
Показник	Контроль	Дослід
Використано молока для технології бринзи, кг	1100	1100
Масова частка жиру у молоці, %	3,4	3,4
Вартість витраченого молока, грн	20020,0	20020,0
Вартість ензимів для сквашування, грн	690,0	745,0
Заробітна плата за переробки партії молока, грн	2800,0	2800,0
Відрахування на амортизацію, грн	10040,0	10040,0
Початок утворення молочного згустку, хв	22,0	23,0
Час формування згустку, хв	38,0	38,0
Одержано бринзи з однієї партії молока, кг	129,8	137,5
Собівартість 1 кг сиру, грн	189,1	178,9

Встановлено зниження собівартості готового продукту у дослідній групі на 5,4% відносно показника у контрольній групі.

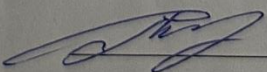
Головний технолог

 О.І. Фролова

Аспірант кафедри харчових технологій
та технологій переробки продукції тваринництва

 В.Ю. Білий

Доктор с.-г. наук, професор

 С.В. Мерзлов

Додаток Б

ЗАТВЕРДЖУЮ

Директор

ПП «Західний Буг»



Акт

**впровадження результатів науково-дослідних,
дослідно-конструкторських та технологічних робіт**

Підприємство де здійснюється впровадження: ПП «Західний Буг», Шептицький район, Львівська область.

Вид впроваджувальних результатів: використання іммобілізованих сичужних ензимів для виробництва м'яких сирів.

Автор наукової роботи: аспірант кафедри харчових технологій та технології переробки продукції тваринництва Білий В.Ю.

Практичні рекомендації: для вирішення проблеми виробництва м'яких сичужних сирів було запропоновано використання іммобілізованих сичужних ензимів.

Характер масштабів впровадження: дослідження були проведені у цеху молочної переробки потужністю 600 кг молочної сировини на добу.

Новизна результатів досліджень: застосовуються нові біотехнологічні підходи, щодо способів екстракції та стабілізації сичужних ензимів та їх використання за технології м'яких сирів.

Було встановлено, що період сквашування молока як за використання іммобілізованих так і нативних сичужних ензимів був однаковим, що не викликало додаткових витрат енергоносіїв на підтримання необхідної температури.

Економічні показники іммобілізованих сичужних ензимів в умовах молочного цеху ПП «Західний Буг»

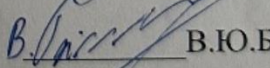
Продовження додатка Б

Показник	Контроль	Дослід
Використано молока для технології бринзи, кг	600	600
Масова частка жиру у молоці, %	3,5	3,5
Вартість витраченого молока, грн	12000,0	12000,0
Вартість ензимів для сквашування, грн	330,0	355,0
Заробітна плата за переробки партії молока, грн	1300,0	1300,0
Відрахування на амортизацію, грн	1000,0	1000,0
Початок утворення молочного згустку, хв	20,0	22,0
Час формування згустку, хв	42,0	42,0
Одержано бринзи з однієї партії молока, кг	77,4	82,2
Собівартість 1 кг сиру, грн	188,6	178,3

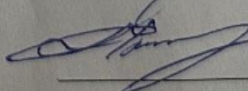
Доведено, що використання іммобілізованих сичужних ензимів вихід бринзи збільшується на 6,2 %. Встановлено зниження собівартості готового продукту у дослідній групі на 5,4% відносно показника у контрольній групі.

Головний технолог

Аспірант кафедри харчових технологій

та технологій переробки продукції тваринництва  В.Ю.Білий

Доктор с.-г. наук, професор

 С.В. Мерзлов

Додаток В

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті в наукових фахових виданнях України, включених до міжнародних наукометричних баз даних Scopus та/або Web of Science Core Collection:

1. Мерзлов С. В., Білий В. Ю., Риндін А. В. Дія екстрагентів на показники елімінації сичужних ензимів. Наукові горизонти. 2019. №. 8 (81). С. 77–81. DOI: 10.33249/2663-2144-2019-81-8-77-81 (0,1 д.а.; здобувачем проведено дослідження, здійснено обробку результатів та їх аналіз, підготовку статті до друку).
2. Bilyi V., Merzlov S., Narizhnyy S., Mashkin Y., Merzlova G. Amino Acid Composition of Whey and Cottage Cheese Under Various Rennet Enzymes. Scientific Horizons. 2021. Vol. 24. № 9. P. 19–25. DOI: 10.48077/scihor.24(9).2021.19-25 (0,15 д.а.; здобувачем проведено дослідження, здійснено обробку результатів та їх аналіз, підготовку статті до друку).

Статті в наукових фахових виданнях України:

1. Білий В. Ю., Мерзлов С. В. Вплив різних сичужних екзимів на технологічні та сенсорні показники бринзи. Вісник Полтавської державної аграрної академії. 2022. № 1. С. 103–109. DOI: 10.31210/visnyk2022.01.13 (0,25 д.а.; здобувачем проведено дослідження, здійснено обробку результатів та їх аналіз, підготовку статті до друку).
2. Bilyi V. Y., Merzlov S. V. Effect of some current enzymes on milk coagulation indicators. Scientific Messenger LNUVMB. Series: Agricultural sciences. 2022. Vol. 24. № 96. P. 144–147. DOI: 10.32718/nvlvet-a9620. (0,1 д.а.; здобувачем проведено дослідження, здійснено обробку результатів та їх аналіз, підготовку статті до друку).
3. Kholodenko I. V., Bila V. V., Bilyi V. Yu., Mashkin, Y. O. Sensory indicators of suluguni cheese when using enzyme preparations of different origins in the technology of soft cheeses. Scientific Messenger LNUVMB. Series: Food Technologies. 2023. Vol. 25. № 99. P. 104–107. DOI: 10.32718/nvlvet-f9918 (0,1 д.а.; здобувачем проведено дослідження, здійснено обробку результатів та їх аналіз, підготовку статті до друку).
4. Наріжний С. А., Білий В. Ю., Рудакова Т. В., Мінорова А. В., Вежлівцева С. П. Формування структури низькокалорійного морозива із рослинними складовими. Збірник наукових праць «Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва». 2023. № 1. С. 124–131. DOI: 10.33245/2310-9289-2023-

178-1-124-131 (0,06 д.а.; здобувачем проведено дослідження, здійснено обробку результатів та їх аналіз, підготовку статті до друку).

5. Bila V. V., Merzlova H. V., Bilyi V. Y., Merzlov S. V., Mashkin Y. O. Microbiological indicators of cottage cheese using different rennet leavens. Scientific Messenger LNUVMB. Series: Food Technologies. 2024. Vol. 26. № 101. P. 3–7. DOI: 10.32718/nvlvet-f10101 (0,08 д.а.; здобувачем проведено дослідження, здійснено обробку результатів та їх аналіз, підготовку статті до друку).

Матеріали науково-практичних конференцій:

1. Білий В. Ю., Мерзлов С. В. Біотехнологічні методи екстракції хімозину та ефективність їх використання. Аграрна освіта та наука: досягнення, роль, фактори росту. Сучасний розвиток технологій тваринництва. Інноваційні підходи в харчових технологіях: матеріали міжнародної науково-практичної конференції. (Білоцерківський НАУ, 21 жовтня 2021 р.). Біла Церква, 2021. С. 51-52. (підготовлено й оформлено матеріали публікації та презентації, особисто здійснено усну доповідь на конференції).

2. Білий В.Ю., Мерзлов С.В. Дія різних сичужних ензимів на показники коагуляції молока. Аграрна освіта та наука: досягнення, роль, фактори росту: Сучасний розвиток технологій тваринництва. Інноваційні підходи в харчових технологіях: матеріали міжнародної науково-практичної конференції (Білоцерківський НАУ, 20 жовтня 2022 р.). Біла Церква, 2022. С. 51-53. (підготовлено й оформлено матеріали публікації та презентації, особисто здійснено усну доповідь на конференції).

3. Bila V.V., Bilyi V.Yu., Merzlova H.V., Merzlov S.V. Indicators of suluguni cheese when using enzyme preparations of different origin. Сучасний розвиток технологій тваринництва. Інноваційні підходи у харчових технологіях: матеріали міжнародної науково-практичної конференції. (Білоцерківський НАУ 26 жовтня 2023 р.). Біла Церква, 2023. С. 74-75. (підготовлено й оформлено матеріали публікації та презентації).

Патент України на корисну модель:

1. Білий В.Ю., Мерзлов С.В., Мерзлова Г.В., Біла В.В., Машкін Ю.О. Спосіб екстракції сичужних ензимів: пат. № 156438; № заявки у 202107113; заявл. 10.12.2021; опубл. 26.06.2024, № 26/2024 (здобувачем проведено патентний пошук та дослідження, здійснено обробку результатів та їх аналіз, підготовлено матеріал до подання).