

<https://doi.org/10.67290/2026.dw.18>

УДК 637.336

**Ольга Валентиновна Лепилкина**, д-р техн. наук

**Анастасия Игоревна Григорьева**

ВНИИМС – филиал ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН, г. Углич

## **ОСОБЕННОСТИ ПРОТЕОЛИЗА ПРИ СОЗРЕВАНИИ СЫРОВ С УЧАСТИЕМ *Penicillium roqueforti***

*В работе представлены результаты изучения динамики протеолиза в голубом сыре из коровьего молока, изготовленного по технологии Рокфора, в процессе 105-суточного созревания. Целью исследования было выявление закономерностей изменения пептидного профиля и молекулярно-массового распределения продуктов протеолиза с использованием метода эксклюзионной хроматографии. Установлено, что процесс протеолиза имеет фазовый характер: лаг-фаза (первые 30 суток) с медленным накоплением пептидов сменяется экспоненциальным ростом их содержания (к 45 суткам), что связано с активацией протеолитических ферментов плесени *Penicillium roqueforti*. Общее количество продуктов протеолиза за период наблюдения возросло почти в 8 раз. Показано, что доминирующей на всех этапах является фракция среднемолекулярных пептидов (2–15 кДа), тогда как доля высокомолекулярных соединений (>15 кДа) снижается в 3 раза, а низкомолекулярных (<2 кДа) — возрастает в 34 раза относительно исходного уровня. В состоянии кондиционной зрелости (45 суток) выявлены характерные особенности пептидного профиля: отсутствие пептидов в диапазоне 7–20 кДа, преобладание фракции 2–6 кДа (60–70 % от общего количества) и суммарное содержание пептидов с молекулярной массой менее 6 кДа, превышающее 75 %. Предложено использовать данный показатель в качестве маркерного признака зрелости сыров данной группы.*

**Ключевые слова:** голубые сыры, *Penicillium roqueforti*, созревание, протеолиз, пептидный профиль, молекулярно-массовое распределение

UDC 637.336

**Olga Valentinovna Lepilkina**, Doctor of Technical Sciences

**Anastasia Igorevna Grigoryeva**

VNIIMS – Branch of Gorbатов Research Center for Food Systems, Uglich

## **FEATURES OF PROTEOLYSIS DURING RIPENING OF CHEESES WITH *Penicillium roqueforti***

*The paper presents the results of studying the dynamics of proteolysis in blue cheese made from cow's milk using Roquefort-style technology during 105 days of ripening. The aim of the*

study was to identify patterns in changes in the peptide profile and the molecular-mass distribution of proteolysis products using size-exclusion chromatography. It was established that proteolysis has a phased character: a lag phase (the first 30 days), with slow peptide accumulation, is followed by exponential growth in their content (by day 45), which is associated with activation of the proteolytic enzymes of the mold *Penicillium roqueforti*. The total amount of proteolysis products increased almost eightfold over the observation period. It was shown that the dominant fraction at all stages is medium-molecular-weight peptides (2–15 kDa), while the share of high-molecular-weight compounds (>15 kDa) decreases threefold and low-molecular-weight compounds (<2 kDa) increases 34-fold relative to the initial level. At the stage of ripeness (45 days), characteristic features of the peptide profile were identified: the absence of peptides in the 7–20 kDa range, the predominance of the 2–6 kDa fraction (60–70% of the total), and a total peptide content below 6 kDa exceeding 75%. It is proposed to use this indicator as a marker of ripeness for cheeses of this group.

**Keywords:** blue cheeses, *Penicillium roqueforti*, ripening, proteolysis, peptide profile, molecular-mass distribution

Сыры, созревающие с участием благородной плесени *Penicillium roqueforti*, относятся к категории голубых сыров (blue cheese). Свое название они получили из-за цвета спор мицелия *Penicillium roqueforti*, развивающегося внутри головки сыра. В зависимости от используемого штамма цвет колоний *Penicillium roqueforti* варьируется от светло- до темно-зеленовато-голубовато-серого и может включать серые, желтоватые и оливково-зеленые оттенки [1, 2, 3].

В мире существует более 100 видов сыра с голубой плесенью, каждый из которых имеет уникальные процессы производства и органолептические свойства. Большинство из них воплощают в себе наследие и традиции того или иного региона. К наиболее известным относятся: французский Рокфор (Roquefort), итальянский Горгонзола (Gorgonzola), английский Стилтон (Stilton), датский Данаблу (Danablu), которые имеют статус защищенного наименования места происхождения/защищенного географического указания (PDO, PGI) и более чем столетнюю историю [4].

Среди голубых сыров Рокфор бесспорно лидирует по популярности. Настоящий французский Рокфор делают исключительно из овечьего молока. Но существуют и его аналоги, изготавливаемые из коровьего молока или из смеси коровьего с овечьим или козьим. Известен положительный опыт использования в качестве сырья при производстве мягкого сыра с плесенью смеси коровьего молока и пахты [5].

В российском сыроделии в настоящее время известны как попытки максимально точно воспроизвести классические технологии сыра Рокфор, так и интересные интерпретации этого знаменитого сыра из местного сырья. Так, например, в Агропромышленном комплексе «Рота Агро» (Московская область) разводят овец породы Лакон, из молока которых делают сыры Блю Лакон и Сан Блю, созревающие в условиях, имитирующих французские пещеры [6].

Другие производители голубых сыров ориентируются на не менее популярные в мире сыры – Стилтон и Горгонзола, изготавливаемые из коровьего молока. Среди них следует отметить Сыроварню «Соболев Сыр» (Свердловская область), которая производит сыр с голубой плесенью под названием Малахит, а также Стилтон Дольче и Стилтон Пиканте [7]. Сыроварня «Альдини» (Московская область) предлагает потребителям сыры из коровьего молока, изготавливаемые по итальянским технологиям: Горгонзола Дольче и Горгонзола Пиканто [8].

Специфическими идентификационными показателями голубых сыров являются наличие прожилок, окрашенных мицелием плесени, а также острый пикантный вкус и интенсивный аромат, часто с грибными или ореховыми нотами. Консистенция может быть разной: от полутвердой, крошащейся до мягкой и маслянистой, тающей во рту.

Органолептические свойства голубых сыров формируются при созревании под влиянием комплекса биохимических процессов, среди которых самым сложным, важным и активно протекающим является протеолиз. Интенсивный протеолиз в сырах с голубой плесенью происходит вследствие действия комплекса ферментов – это протеазы, выделяемые молочнокислыми бактериями закваски, сычужный фермент, плазмин, а также протеазы, экзо- и эндопептидазы, продуцируемые *Penicillium roqueforti*. Несмотря на то, что *Penicillium roqueforti* рассматривают в качестве вспомогательной культуры для производства голубых сыров, она считается основным протеолитическим агентом [1–4].

В процессе созревания сыров вследствие протеолиза образуются пептиды с разной молекулярной массой, которые наряду со свободными аминокислотами играют важную роль в формировании уникального вкуса и аромата каждого вида сыра. Полный набор пептидов представляет собой так называемый пептидный профиль сыра [9–12]. Его анализ позволяет понять, как созревала сыр и выявить отклонения в процессе протеолиза, оказывающие отрицательное влияние его на качество. По пептидному профилю можно оценить степень зрелости сыра, установить его видовую принадлежность и подлинность [13]. Совокупность пептидов, составляющих пептидный профиль, характеризуется их молекулярно-массовым распределением, которое получают путем разделения пептидов с помощью электрофоретических или хроматографических методов [14].

Хотя процесс созревания голубых сыров изучался многими учеными [2, 12, 15–20], данные о динамике пептидного профиля и молекулярно-массового распределения в процессе созревания фрагментарны или отсутствуют, что не позволяет составить целостную картину протеолитических изменений.

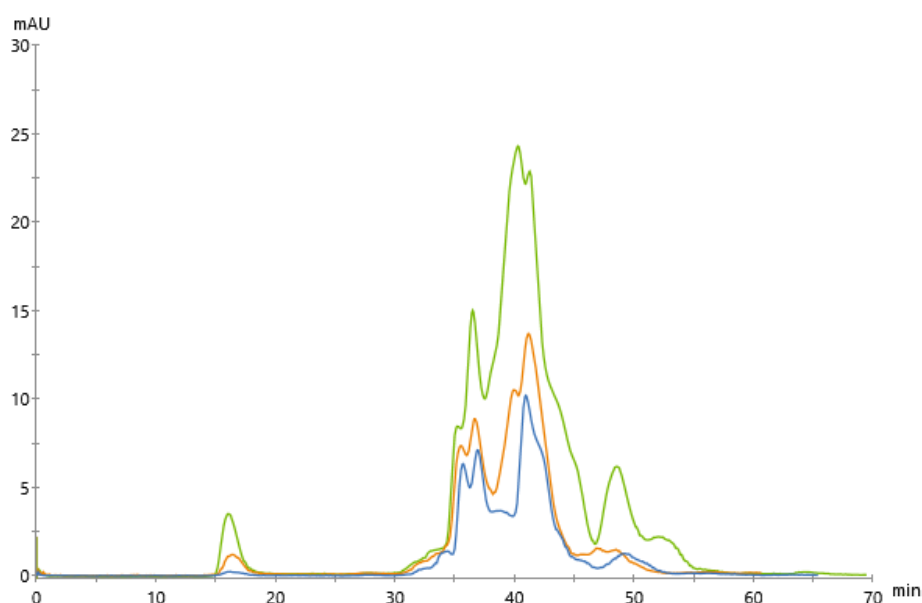
Целью настоящей работы было на примере голубого сыра, изготовленного из коровьего молока по технологии Рокфора, выявить закономерности изменения пептидного профиля и молекулярно-массового распределения в процессе созревания, обуславливающие особенности протеолиза сыров данной группы.

Исследования проводили, используя метод эксклюзионной хроматографии, на приборе АКТА pure 25 (Швеция) по методике, описанной в СТО ВНИИМС 069-2026.

Все выявленные на хроматограммах пептиды в зависимости от молекулярной массы были разделены на три фракции: высокомолекулярная, включающая белки и полипептиды с молекулярной массой более 15 кДа; средномолекулярная – полипептиды и олигопептиды с молекулярной массой от 2 до 15 кДа; низкомолекулярная – олигопептиды и свободные аминокислоты с молекулярной массой менее 2 кДа.

Количественную оценку образующихся пептидов проводили по площадям под пиками на полученных хроматограммах, выраженных в условных единицах  $\text{min} \cdot \text{mAu}$ , представляющих собой произведение единиц времени ( $\text{min}$ , ось X) на единицы оптического поглощения ( $\text{mAu}$ , ось Y). Молекулярно-массовое распределение (в %) рассчитывалось компьютерной программой, исходя из количества каждой фракции, полученной после разделения в колонке.

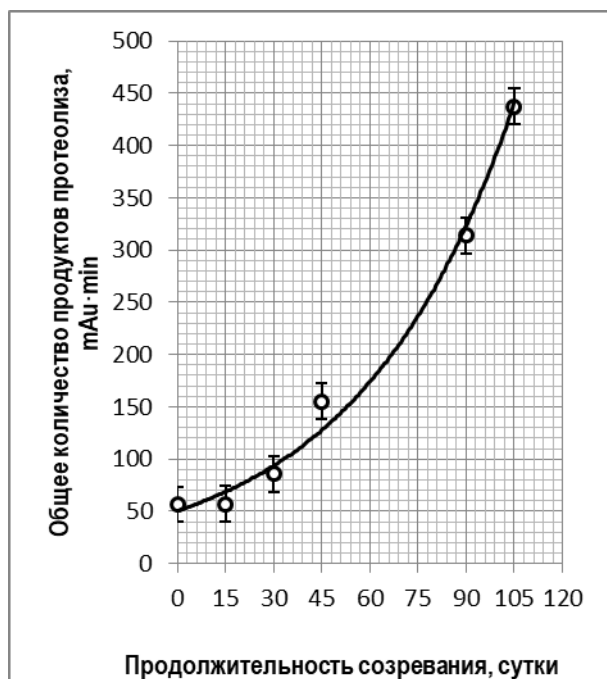
На Рис. 1 представлены наложенные хроматографические профили, отражающие динамику накопления продуктов протеолиза в течение 45 суток созревания.



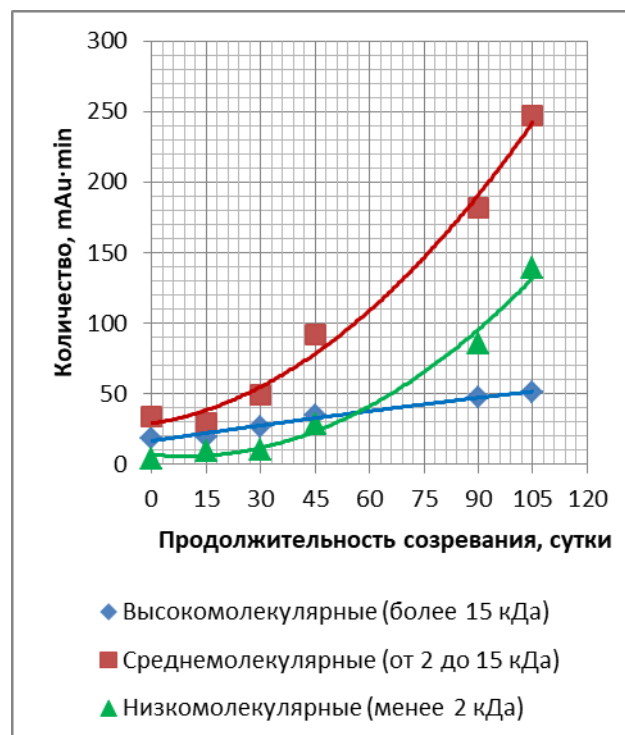
**Рисунок 1.** Пептидные профили сыра: синяя линия – после самопрессования, оранжевая – 30 суток, зелёная – 45 суток

С увеличением срока созревания наблюдается возрастание количества пептидных фракций. Данная тенденция визуально подтверждается увеличением площади под хроматографическими пиками и ростом их амплитуды: наименьшее содержание продуктов протеолиза зафиксировано после самопрессования (синяя линия), более высокое – на 30 суток созревания (оранжевая линия), а наибольшее за исследованный период времени – на 45 суток (зелёная линия), что свидетельствует о нарастающей активности протеолиза в процессе созревания сыра.

После расчета площадей под хроматографическими пиками определено суммарное количество пептидов в сыре в разные сроки созревания, выраженное в условных единицах  $\text{mAu} \cdot \text{min}$  (Рис. 2), а также суммы пептидов, относящихся к высокомолекулярным (более 15 кДа), средномолекулярным (от 2 до 15 кДа) и низкомолекулярным (менее 2 кДа) фракциям (Рис. 3).



**Рисунок 2.** Увеличение общего количества продуктов протеолиза при созревании сыра



**Рисунок 3.** Изменение количества высокомолекулярных, среднемолекулярных и низкомолекулярных пептидов при созревании сыра

На Рис. 2 зафиксирован рост общего количества продуктов протеолиза. За 105 суток наблюдения увеличение произошло почти в 8 раз. В первые 30 суток происходило медленное накопление пептидов, что, очевидно, связано с адаптацией заквасочного микробиома и началом активации протеолитических ферментов. Количество продуктов протеолиза за этот период увеличилось всего в 1,5 раза. Медленное протекание протеолиза на первом этапе следует рассматривать как лаг-фазу этого процесса.

После лаг-фазы наступил экспоненциальный рост – фаза активного протеолиза. В этот период протеолиз шел с ускорением, что является логичной тенденцией, т.к. накапливающиеся продукты распада белка могут активировать работу ферментов, а также рост заквасочных микроорганизмов, являясь необходимым питательным субстратом для их развития. Кроме того, после 30 суток созревания начала активно развиваться плесень *Penicillium roqueforti*, которая продуцирует мощные протеолитические ферменты, резко ускоряющие распад белков [15, 16, 17].

Если в первые 30 суток созревания главными протеолитическими агентами были ферменты молочнокислых бактерий закваски и сычужный фермент, то после 30 суток к ним присоединились ферменты *Penicillium roqueforti*, которые становятся доминирующими в протеолизе [3, 18, 19].

Рис. 3 иллюстрирует устойчивый рост содержания всех пептидных фракций в ходе созревания сыра. Наибольшее увеличение количества показали среднемолекулярные пептиды. Это указывает на то, что образование среднемолекулярных пептидов является основной зоной протеолитической активности ферментов. В этой

зоне одновременно протекают как первичный протеолиз, в результате которого образуются полипептиды с молекулярными массами более 10 кДа, так и вторичный протеолиз, разрывающий крупные пептиды на более мелкие фрагменты. Являясь промежуточной фракцией между высокомолекулярными и низкомолекулярными продуктами протеолиза, среднемолекулярные пептиды демонстрируют наибольшую динамичность

Количество высокомолекулярных и низкомолекулярных пептидов также растет, но менее интенсивно. Небольшое увеличение количества высокомолекулярных пептидов – крупных фрагментов белковых молекул можно объяснить продолжающимся первичным протеолизом, при котором скорость образования новых крупных пептидов пока выше скорости их дальнейшего распада на более мелкие фрагменты.

Низкомолекулярная фракция, несмотря на самые маленькие абсолютные количественные значения в начале созревания, демонстрирует самый быстрый относительный рост. Так, если количество среднемолекулярных пептидов за весь период наблюдения увеличилось в 7 раз, то количество низкомолекулярных (олигопептидов и аминокислот) за это время выросло почти в 34 раза.

Следует отметить пересечение кривых высокомолекулярной (> 15 кДа) и низкомолекулярной (< 2 кДа) фракций на 60-е сутки созревания. Этот момент свидетельствует о смене баланса протеолиза: завершается первичный гидролиз крупных белков и начинается преобладание конечных низкомолекулярных продуктов вторичного протеолиза. Данная точка может рассматриваться как технологический рубеж перехода сыра в стадию глубокой зрелости.

На Рис. 4 представлено молекулярно-массовое распределение пептидных фракций в зависимости от срока созревания сыра.

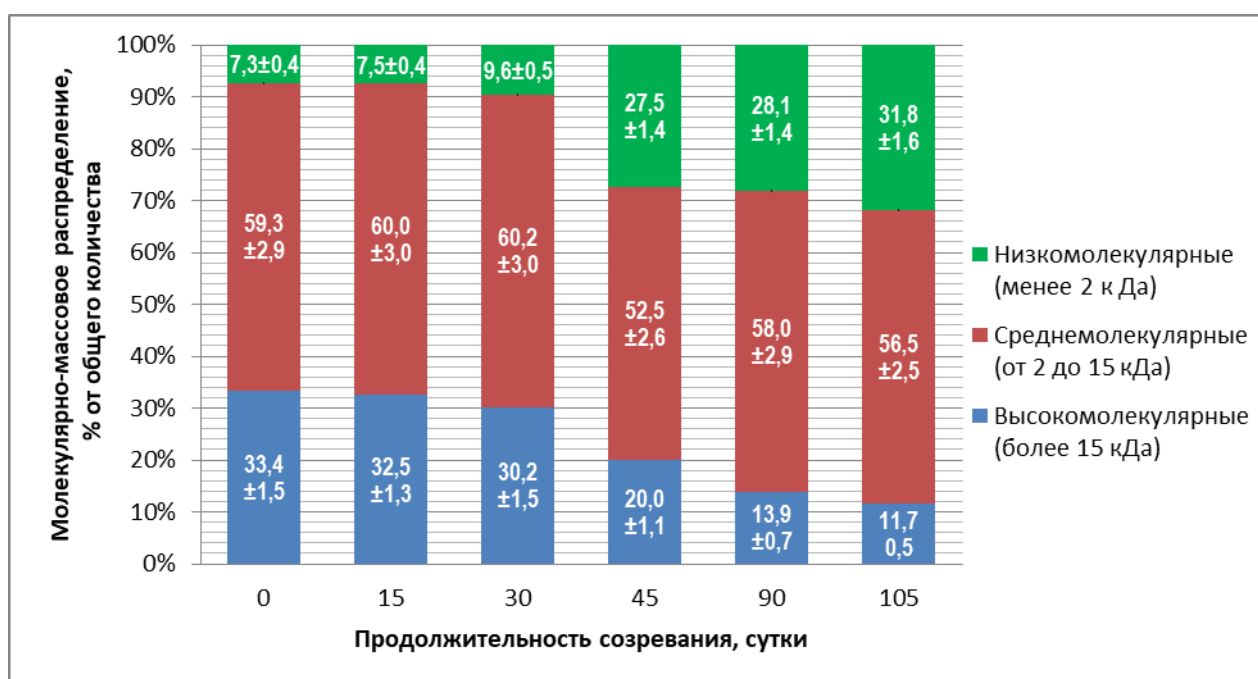


Рисунок 4. Молекулярно-массовое распределение продуктов протеолиза при созревании сыра

Анализ этих данных показывает:

– доля низкомолекулярной фракции в общем количестве образующихся пептидов в первые 30 суток остаётся на стабильно низком уровне (7,3–9,6 %). Затем к 45 суткам резко возрастает до 27,5% и продолжает расти до 31,8% к 105 суткам, увеличившись более чем в 4 раза по сравнению с началом созревания;

– доля среднемолекулярной фракции остаётся доминирующей на протяжении всего созревания (52,5–60,2%), что указывает на то, что пептиды с молекулярными массами от 2 до 15 кДа являются основным пулом промежуточных продуктов протеолиза;

– доля высокомолекулярной фракции постепенно снижается с 32,5% (0 суток) до 11,7% (105 суток), то есть уменьшается почти в 3 раза, что отражает распад исходных крупных белков под действием протеолитических ферментов.

Полученные данные свидетельствуют о глубоком протеолизе, протекающем в процессе созревания сыра с участием *Penicillium roqueforti*: доля высокомолекулярных фракций закономерно снижается, а доля низкомолекулярных продуктов гидролиза прогрессивно нарастает, достигая максимума к 105 суткам. Среднемолекулярные пептиды выполняют роль промежуточного пула, поддерживая стабильную долю на всех этапах созревания.

Считается, что кондиционной зрелости сыры этого типа достигают к 45 суткам созревания [20]. В связи с этим проведен детальный анализ пептидов, присутствующих в сыре этого возраста, чтобы выявить характерные особенности пептидного состава, которые могли бы служить маркерами зрелости и идентификационными признаками готового продукта.

Результаты анализа показали следующее.

Высокомолекулярная фракция содержала белки и полипептиды с молекулярными массами от 20 до 60 кДа. Из них количественно преобладали пептиды с молекулярными массами от 20 до 27 кДа. Эта группа пептидов была постоянной для всех исследованных образцов (n=3) и занимала в общем количестве пептидов в сыре 10–13 %. Кроме них во всех повторностях присутствовали крупные полипептиды с молекулярными массами от 40 до 60 кДа в небольшом количестве – порядка 2–7 % от всех пептидов.

В пептидных профилях всех исследованных сыров отсутствовали пептиды с молекулярными массами от 7 до 20 кДа.

Среднемолекулярная фракция была представлена только пептидами с молекулярными массами от 2 до 6 кДа, которые занимали 60–70 % от общего количества пептидов.

Низкомолекулярные пептиды и свободные аминокислоты с молекулярными массами менее 1 кДа количественно составляли 10–15 % от общего количества пептидов.

Таким образом, характерными особенностями пептидного профиля зрелого голубого сыра являются:

- отсутствие пептидов с молекулярными массами от 7 до 20 кДа,
- большое количество пептидов с молекулярными массами от 2 до 6 кДа,

– суммарное количественное содержание средне-, низкомолекулярных пептидов и аминокислот с молекулярными массами менее 6 кДа в общем объеме составляет максимальное количество – 75–90 %.

### Выводы

Особенности созревания сыров, созревающих при участии плесневых грибов, развивающихся внутри сырного теста (типа Рокфора), обусловлены существенным влиянием на процесс протеолиза протеолитической системы плесневой культуры *Penicillium roqueforti*, эффективно действующей при наличии субстрата из более мелких пептидов, которые накапливаются ко второй трети срока созревания.

Установлена смена динамики протеолиза после 30 суток созревания, выражающаяся в переходе от лаг-фазы к экспоненциальному росту общего количества продуктов протеолиза, что обусловлено активацией и активным развитием *Penicillium roqueforti*.

Характерными особенностями пептидного профиля сыра в состоянии кондиционной зрелости (в возрасте 45 суток) является отсутствие пептидов с молекулярными массами от 7 до 20 кДа и большое количество пептидов с молекулярными массами от 2 до 6 кДа: 60–70 % от общего количества пептидов.

Маркерным признаком зрелости сыра из коровьего молока, созревающего при участии плесневой культуры *Penicillium roqueforti*, следует считать количество средне- и низкомолекулярных пептидов и аминокислот с молекулярными массами менее 6 кДа, превышающее 75 % в общем объеме пептидов, составляющих пептидный профиль.

### Список использованной литературы:

1. **Coton, E.** *Penicillium roqueforti*: an overview of its genetics, physiology, metabolism and biotechnological applications / E. Coton, M. Coton, N. Hymery, J. Mounier, J.L. Jany // *Fungal Biology Reviews*. 2020. Vol. 34. № 2. P. 59–73. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2020.03.001>
2. **Остроухова, И.Л.** Формирование вкусового профиля голубых сыров / И.Л. Остроухова, В.А. Мордвинова // *Молочнохозяйственный вестник*. 2020. №. 1(37). С. 115–127. <https://www.elibrary.ru/ohsgtp>
3. **López-Díaz, T.M.** Blue cheeses: microbiology and its role in the sensory characteristics / T.M. López-Díaz, Á. Alegría, J.M. Rodríguez-Calleja, P. Combarros-Fuertes, J.M. Fresno, J.A. Santos, A.B. Flórez, B. Mayo // *Dairy*. 2023. Vol. 4. №. 3. P. 410–422. <https://doi.org/10.3390/dairy4030027>
4. **Ferroukhi, I.** A comprehensive overview of blue-veined cheeses / I. Ferroukhi, C. Chassard, J. Mardon // *International Dairy Journal*. 2024. Vol. 154. P. 105926. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2024.105926>
5. **Стурова, Ю.Г.** Оценка связи биохимических процессов и качества продукта при разработке биотехнологии сыра с благородной плесенью / Ю.Г. Стурова, А.В. Гришкова, В.В. Коньшин // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2022. Т. 12. № 4(43). С. 566–575. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-4-566-575>
6. Агрпромышленный комплекс «Рота Агро» - официальный сайт: [Электронный ресурс]. URL: <https://rota-agro.ru/>. (Дата обращения: 02.03.2026).
7. Сыроварня «Соболев Сыр» - официальный сайт: [Электронный ресурс]. URL: <https://sobolevcheese.ru/>. (Дата обращения: 02.03.2026).
8. Сыроварня «Альдини» - официальный сайт: [Электронный ресурс]. URL: <https://opt.aldini.org/#production>. (Дата обращения: 02.03.2026).
9. **Helal, A.** Peptidomics Profile, Bioactive Peptides Identification and Biological Activities of Six Different Cheese Varieties / A. Helal, D. Tagliacruzchi // *Biology*. 2023. Vol. 12. № 1. P.78. <https://doi.org/10.3390/biology12010078>

10. **Solieri, L.** Peptide Profiling and Biological Activities of 12-Month Ripened Parmigiano Reggiano Cheese / L. Solieri, A. Baldaccini, S. Martini, A. Bianchi, V. Pizzamiglio, D. Tagliazucchi // *Biology*. 2020. Vol. 9. № 7. P. 170. <https://doi.org/10.3390/biology9070170>
11. **Zhang, D.** Peptide Profile Changes in Buffalo Milk Cheese during Different Storage Periods and Characterization of Novel Bioactive Peptides through Peptidomics / D. Zhang, M. Yu, W. Dong, G. Yan, Y. Shi, A. Huang, X. Wang // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2024. Vol. 73. № 1. P. 571–583. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.4c09837>
12. **Sánchez-Rivera, L.** Peptide profiling in cheeses packed using different technologies / L. Sánchez-Rivera, I. Recio, M. Ramos, J.Á. Gómez-Ruiz // *Journal of Dairy Science*. 2013. Vol. 96. № 6. P. 3551–3557. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6302>
13. **Мягконосов, Д.С.** Особенности протеолиза у сыров различных видовых групп / Д.С. Мягконосов, В.А. Мордвинова, Д.В. Абрамов, И.Н. Делицкая // *Сыроделие и маслоделие*. –2014. № 2. С. 24–27. <https://elibrary.ru/rzsupt>
14. **Лепилкина, О.В.** Протеомные методы разделения и идентификации белков молока / О.В. Лепилкина, А.И. Григорьева // *Пищевые системы*. 2024. Т. 7. № 4. С. 560–567. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2024-7-4-560-567>
15. **Кушевская, М.А.** Изучение интенсивности протеолиза ферментных систем грибов рода *Penicillium* совместно с сычужным ферментом / М.А. Кушевская, О.В. Шабанова, О.В. Кригер, Л.А. Остроумов, Л.М. Захарова, И.А. Смирнова // *Техника и технология пищевых производств*. 2015. № 4 (39). С. 30–34.
16. **Кантерова, А.В.** Характеристика штаммов мицелиальных грибов *Penicillium roqueforti* и *Penicillium camemberti* из фонда белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов, перспективных для использования в пищевой промышленности / А.В. Кантерова, А.В. Савчик, Г.И. Новик // *Наука, питание и здоровье*. 2019. С. 245–250.
17. **Mane, A.** Proteolysis in Danish blue cheese during ripening / A. Mane, F. Ciocia, T.K. Beck, S.K. Lillevang, P.L. McSweeney // *International Dairy Journal*. 2019. Vol. 97. P. 191–200. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.05.017>
18. **Cantor, M.D., Hornnes, M.H.D.** Cheese. Chemistry, Physics and Microbiology. Chapter 36 - Blue Cheese. USA: Academic press, 2025, P. 929–960. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-15956-5.00031-2>
19. **Chavez, R.** Secondary Metabolites Produced by the Blue-Cheese Ripening Mold *Penicillium roqueforti*; Biosynthesis and Regulation Mechanisms / R. Chavez, I. Vaca, C. Garsia-Estrada // *Journal of Fungi*. 2023. № 9(4). P. 459. <https://doi.org/10.3390/jof9040459>
20. ТУ 9225-085-04610209-2002 «Сыр с плесенью Голубой». Углич: ВНИИМС.