

Production of the substitute of rennet from ducks processing waste

V.G. VOLIK, T.V. DOIGIKH, K.I. LOBZOV, E.I. MUKHTAROV

Scientific-Industrial Association "Complex" of poultry processing, glue and gelatin industry, Moscow, USSR

In modern investigations of proteolytic ferments the particular consideration is given to acid proteinases. The proteinases of the animals gastric juice are well-known. The poultry glandular stomachs are also the rich source of the active proteolytic ferment pepsin, which may be used in cheese-making as an effective substitute of scarce rennet. The task of the investigation was to work out the method of duck pepsin isolation and to study the possibilities of its using in cheese-making. It was worked out the technology of duck pepsin obtaining, the main stages of which are autolysis of fined glandular stomachs and salting-out of ferments. It was possible to carry out the purposeful investigation and to choose the optimum conditions of ferment extraction with minimum expenditure thanks to the fact, that the method of mathematical planning of the experiment, in particular FFE², was used. The output of standard pepsin (100 000 of cond. units) was 80-100g from 1 kg of the raw material when using the suggested technology. The properties of duck pepsin, especially important in cheese-making (milk coagulability, proteolytic activity, stability), were studied. It was proved, that many properties of duck pepsin are similar to those of rennet. The investigations showed, that obtained duck pepsin may be used in cheese-making as an effective substitute of rennet.

Herstellung des Ersatzlabferments aus den Entebehandlungsabfälle

V.G. WOLIK, T.W. DOLGICH, K.I. LOBSOW und E.I. MUKHTAROW

Wissenschaftliche Betriebsvereinigung für Geflügel-, Leim- und Gelatineindustrie "Komplex", Moskau, UdSSR

In modernen Untersuchungen der proteolytischen Fermente ist eine wichtige Bedeutung von Proteinasen bewiesen. Besonders gut sind Magersaftproteinasen der Tiere studiert. Drüsengeflügelmagen sind auch Reichbezugsquelle des aktive, proteolytische Ferments - Pepsins, das in der Käseerei als effektiver Ersatzstoff des Defizitlabferments verwendet. Das Untersuchungsproblem ist Ausarbeitung der Methode zur Entepepsinsausscheidung und Studium der Möglichkeitsverwendung des Entepepsins in der Käseerei. Es wird die Technologie zum Entepepsinsempfang ausgearbeitet; Grundentwicklungsstufen dieser Technologie sind Autolyse der zerkleinerte Drüsenmagen und Fermentsaussalzen. Die Verwendungsmethode der mathematische Planung des Experiments (insbesondere VFE²) gab Möglichkeit unter Mindestkosten die zweckmäßige Untersuchung und Nachforschung der Optimalbedingungen zur Fermentextraktion durchzuführen. Der Standardpräparatsertrag des Pepsins (100 000 bedingte Einh.) nach der vorgeschlagene Technologie ist 80-100 g von 1 kg des Rohstoffes. Dabei werden Entepepsineigenschaften, besonders wichtige bei der Käseherstellung (Milchgerinnungs-, Proteolyktivität; Stabilität), studiert. Es ist erwiesen, dass Entepepsin nach manchen Eigenschaften dem Labferment ähnlich ist. Die Untersuchungen werden gezeigt, dass das erhaltende von uns Entepepsinpräparat in der Käseerei als effektiver Ersatzstoff des Labferments verwenden kann.

Production d'un succédané du labferment à partir des déchets de transformation des canards
V.G.VOLIK, T.V.DOIGUIKH, K.I.LOBZOV et E.I.MOUKHTAROV

Association de recherche et de production pour les industries de transformation de la volaille et de production de la colle et de la gélatine "Complexe", Moscou, URSS

On attribue une attention particulière aux protéinases acides dans l'étude moderne des ferments protéolytiques. On a déjà étudié les protéinases du suc gastrique des animaux. Les estomacs ferrugineux des oiseaux sont aussi une source riche du ferment actif protéolytique - la pepsine - qu'on peut utiliser dans la fromagerie en qualité d'un succédané effectif du labferment qui est en déficience.

Les recherches visaient à élaborer une méthode pour extraire la pepsine de canard et à étudier les possibilités de son utilisation dans la fromagerie.

On a élaboré une technologie pour obtenir la pepsine de canard dont les étapes essentielles sont l'autolyse des estomacs ferrugineux hachés et le relargage du ferment. L'utilisation de la méthode de planification mathématique de l'expérience, en particulier de la méthode complète factrice ($MCF 2^2$), a permis de mener une recherche orientée vers un but précis avec de minimales dépenses et une étude des conditions d'ordre optimal pour extraire le ferment.

Le rendement d'une préparation standardisée de la pepsine (100000 unités conditionnelles) conformément à la technologie proposée est de 80-100 gr à partir d'un kilo des matières.

On a étudié les qualités de la pepsine de canard, celles les plus importantes pour la fromagerie (activité de coagulation du lait, activité protéolytique, stabilité). Il est prouvé que selon certaines qualités la pepsine de canard est analogue au labferment.

Les recherches ont montré que notre préparation de la pepsine de canard peut être utilisée dans la fromagerie en qualité du succédané effectif du labferment.

Производство заменителя сычужного фермента из отходов переработки уток

В.Г. ВОЛИК, Т.В. ДОЛГИХ, К.И. ЛОБЗОВ, Э.И. МУХТАРОВ

Научно-производственное объединение птицеперерабатывающей и клеежелатиновой промышленности "Комплекс", Москва, СССР

В современных исследованиях протеолитических ферментов важное место уделяется кислым протеиназам. Особенно хорошо изучены протеиназы желудочного сока животных. Железистые желудки птиц также являются богатым источником активного протеолитического фермента - пепсина, который может быть использован в сыроделии как эффективный заменитель дефицитного сычужного фермента.

Задача исследования состояла в разработке метода выделения утиного пепсина и изучении возможности его использования в сыроделии.

Разработана технология получения утиного пепсина, основными этапами которой являются автолиз измельченных железистых желудков и высаливание фермента. Применение метода математического планирования эксперимента, в частности $ПФЭ 2^2$, дало возможность с минимальными затратами провести целенаправленное исследование и поиск оптимальных условий экстракции фермента.

Выход стандартного препарата пепсина (100 тыс. усл.ед.) по предлагаемой технологии составляет 80-100 г из 1 кг сырья.

Изучены свойства утиного пепсина, особенно важные при выработке сыров (молокозвертывающая, протеолитическая активность, устойчивость). Доказано, что по ряду свойств утиный пепсин сходен с сычужным ферментом.

Исследования показали, что полученный нами препарат утиного пепсина может быть использован в сыроделии как эффективный заменитель сычужного фермента.

Производство заменителя сычужного фермента из отходов переработки уток.

В.Г.ВОЛИК, Т.В.ДОЛГИХ, К.И.ЛОБЗОВ, Э.И.МУХТАРОВ

Научно-производственное объединение птицеперерабатывающей и жележелатиновой промышленности "Комплекс", Москва, СССР

Решение проблемы подбора заменителей сычужного фермента все еще остается актуальным. Наибольшее значение придается кислым протеиназам животного происхождения. В настоящее время детально изучены и успешно используются в сыроделии говяжий, свиной и куриный пепсины [1,2,3,4].

Задача настоящих исследований — разработка способа получения заменителя сычужного фермента из железистых желудков уток и его характеристика.

В основу разработки способа выделения утиного фермента был положен метод автолиза [4], более эффективный, чем многостадийный процесс экстракции [5].

Основными этапами метода являются: измельчение сырья → подкисление → автолиз → слив автолиза → охлаждение автолизата → высаливание → уплотнение высола → сушка высола → измельчение сухого высола → нормализация до стандартной активности.

При отработке оптимальных параметров выделения применен метод планирования эксперимента, который проводился в два этапа: получение линейного приближения поверхности отклика (в качестве матрицы планирования использовалась матрица полнофакторного эксперимента — ПФЗ²) и поиск оптимума по методу крутого восхождения, это позволило с минимальными затратами провести целенаправленное исследование и поиск оптимальных параметров процесса автолиза. Выход утиного пепсина по предлагаемому методу на разных стадиях выделения представлен в табл. I.

Т а б л и ц а I
T a b l e 1

Выход пепсина на стадиях выделения
Yield of pepsin on stages of obtaining

Стадия выделения Stage of obtaining	Вес, объем г (мл) Weight, g volume, ml	Концентрация пепсина, мг/г (мг/мл) Pepsin concentration, mg/g (mg/ml)	Кол-во пепсина, мг Pepsin quantity, mg	Выход, % Yield, %
Исходный продукт Initial product	100	1,8	180	100
Автолизат autolysate	60	1,5	90	50
Жидкий высол Liquid cake after salting-out	1	40	40	22
Сухой высол Dry cake after salting-out	0,6	22	13,2	7,4

Полученный препарат имел молокосвертывающую активность 700–900 тыс. условных единиц. Выход стандартного препарата (100 тыс. условных единиц) из сырья 70–90 г из 1 кг. Промышленный препарат был очищен методом ионообменной хроматографии [6]. Для разделения пепсинов был использован метод изoeлектрической фокусировки на амфолинах [7]. Фракции, содержащие потенциальную протеолитическую активность, собирали, обессоливали, высушивали и использовали для дальнейших исследований (рис. I). Аминокислотный состав пепсинов определяли по методу Мура и Штейна [8]. При изучении аминокислотного состава установлено, что утиный пепсин содержит 30 карбоксильных и

II основных групп и, следовательно, является менее кислым белком, чем свиной пепсин. Для использования ферментов в сыроделии важнейшими свойствами являются протеолитическая (гидролиз гемоглобина и казеина) и пептидазная активность, молокосвертывающая активность, устойчивость.

Протеолитическую активность пепсина определяли по гидролизу гемоглобина (за 100% принимали активность свиного пепсина) при pH 2,0 (табл. 2).

Т а б л и ц а 2
Table 2

Протеолитическая активность по гидролизу гемоглобина
Proteolytic activity by haemoglobin hydrolysis

Ферментный препарат Ferment preparation	Относительная активность, % Relative activity, %
Утиный пепсин Duck pepsin	120
Куриный пепсин Chicken pepsin	150
Свиной пепсин Pig pepsin	100
Говяжий пепсин Beef pepsin	60
Сычужный фермент Rennet	0

Данные табл. 2 показывают, что протеолитическая активность утиного пепсина выше, чем сычужного фермента, говяжьего и свиного пепсинов.

Результаты по гидролизу казеина при pH 5,5 (важном для созревания сыров) представлены на рис. 2. Установлено, что утиный и куриный пепсины значительно активнее всех исследуемых ферментов [9].

Пептидазная активность определялась по гидролизу синтетического субстрата L- ацетил - L- фенилаланил - L- тирозина при pH 1,95 (табл. 3) [10].

Т а б л и ц а 3
Table 3

Пептидазная активность ферментных препаратов
Peptidase activity of ferment preparation

Наименование ферментов Ferment	Относительная пептидазная актив- ность, % Relative peptidase activity, % (10Е)	Пептидазная активность, % (свиной пепсин принят за 100%) Peptidase activity, % (pig pepsin-100%)
Сычужный фермент Rennet	1,0	14
Свиной пепсин Pig pepsin	7,2	100
Куриный пепсин Chicken pepsin	1,88	25
Утиный пепсин Duck pepsin	1,4	22

Несмотря на высокую протеолитическую активность утиного пепсина, пептидазная активность его значительно ниже свиного и куриного пепсинов. Вероятно, высокая протеолитическая активность не всегда может быть достаточной для выяснения вопроса о пригодности заменителя сычужного фермента.

Молокосвертывающая активность определялась в диапазоне pH 6,4–6,8 [9]. Данные представлены на рис. 3.

Результаты исследования устойчивости в нейтральной и щелочной зоне pH приведены на рис. 4. По сравнению с известными заменителями сычужного фермента животного происхождения утиный пепсин является наиболее устойчивым [10].

Проведены экспериментальные выработки костромского сыра с использованием утиного пепсина. Сыр получил высокую оценку.

В результате проведенных исследований разработан эффективный способ выделения молоко-свертывающего фермента из железистых желудков уток.

Получен высокоочищенный препарат утиного пепсина на ДЭАЭ-целлюлозе, определен его аминокислотный состав. Показано, что утиный пепсин является менее кислым белком по сравнению со свиным и говяжьим пепсином, так как содержит больше основных групп.

Сравнительная характеристика пепсинов животного происхождения позволяет сделать вывод, что молокосвертывающая активность утиного пепсина близка к сычужному ферменту. Сильно выраженная зависимость от pH молокосвертывающей активности ограничивает применение свиного пепсина при использовании молока с pH 6,6 и выше. В то же время зависимость от pH молокосвертывающей активности утиного пепсина выражена незначительно и почти не отличается от рассматриваемой зависимости для сычужного фермента.

Большая часть заменителей сычужного фермента обладает высокой пептидазной активностью, в то же время пептидазная активность утиного пепсина незначительно отличается от активности сычужного фермента.

Высокая устойчивость в нейтральной и щелочной зонах pH и низкая пептидазная активность утиного пепсина позволяют считать его наиболее эффективным заменителем сычужного фермента в сыроделии.

Литература

1. Thomas J. "Milchwiss.Ht.", 5, 26, 27с, 1971.
2. Green M.L. "J.Dairy Res.", 39, 261, 1972.
3. Bohak Z. "J.of Biol. Chem.", 17, 244, 1969.
4. В.Г. Волик, Т.В. Долгих, К.И. Лобзов, Н.С. Новгородова. XXIII Европейский конгресс научных работников мясной промышленности. Доклады сессии Л., М., 1977.
5. Патент № I469579, Лондон.
6. Л.М. Гинодман. Современные методы в биохимии, "Медицина", М., 1964.
7. Furlong C.E., Weiner J.H. "Biochem. and biophys. Research Com.", 3, 1076, 1970.
8. Moore S., Steen W.N. "J.of Biol. Chem.", 211, 907, 1954.
9. В.И. Звягинцев, Т.В. Долгих. Обзорная информация ЦНИИТЭИмясомолпром СССР, № 2, 1–7, 1972.
10. Л.А. Локшина. "Биохимия", 39, 3, 1974.

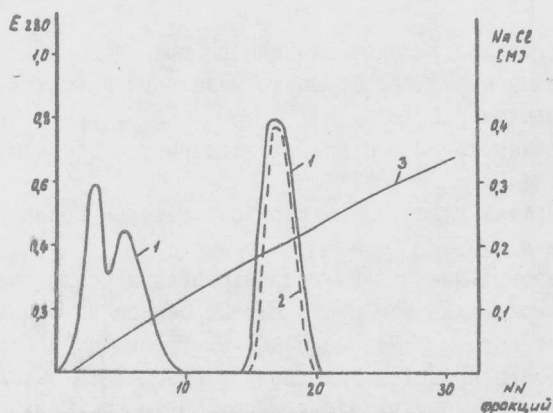


Рис. 1. Хроматограмма препарата утиного пепсина на ДЭАЭ-целлюлозе: 1-оптическая плотность при 280 нм; 2-активность фермента во фракциях, мг/мл; 3- концентрация NaCl, М.

Fig. 1. Chromatogram of chicken pepsin on DEAE-cellulose; 1-optical density at 280nm; 2-ferment activity in fractions, mg/ml; 3-concentration NaCl, M.

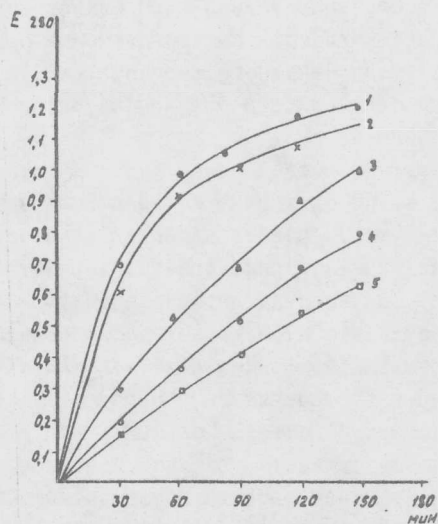


Рис. 2. Сравнительные данные по гидролизу казеина при pH 5,5: 1-куриный пепсин; 2-утиный пепсин; 3-свиной пепсин; 4-говяжий пепсин; 5-сычужный фермент.

Fig. 2. Comparative data of hydrolysis of caseine at pH 5,5; 1-chicken pepsin; 2-duck pepsin; 3-pig pepsin; 4-beef pepsin 5-rennet.

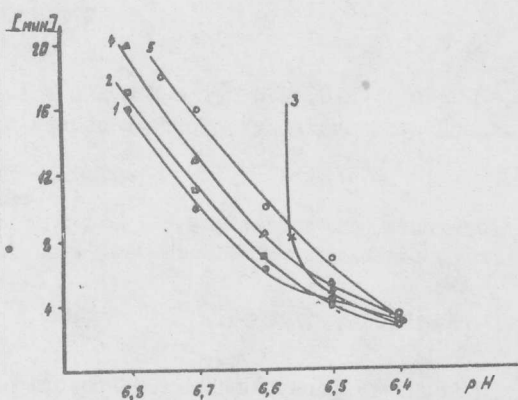


Рис. 3. Зависимость молокосвертывающей активности ферментов от pH: 1-сычужный фермент; 2-говяжий пепсин; 3-свиной пепсин; 4-куриный пепсин; 5-утиный пепсин.

Fig. 3. Dependence of milk-turning activity of ferment on pH; 1-rennet; 2-beef pepsin; 3-pig pepsin; 4-chicken pepsin; 5-duck pepsin.

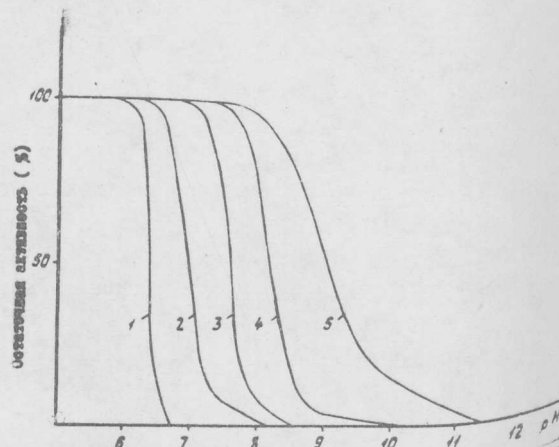


Рис. 4. Зависимость устойчивости ферментов от pH при 35°C: 1-свиной пепсин; 2-говяжий пепсин; 3-сычужный фермент; 4-куриный пепсин; 5-утиный пепсин.

Fig. 4. Dependence of ferment stability on pH at 35°C; 1-pig pepsin; 2-beef pepsin; 3-rennet; 4-chicken pepsin; 5-duck pepsin.