

THE EFFECT OF EXTRACTORS ON INDICATORS OF ELIMINATION OF EXPOSED ENZIMS**S. Merzlov, V. Bilyi, A. Rindin**

e-mail: Valentuna.Bila@ukr.net

Bila Tserkva National Agrarian University

8/1, Cathedral Square, Bila Tserkva, Kyiv Oblast, 09117, Ukraine

Saturated enzymes are an integral part of the technology of soft cheeses, which means that the market requires a significant amount of enzyme preparation, as recent studies have shown that consumption of whey cheese in Ukraine is increasing. An important aspect is that almost all industrial milk processing companies use a microbial analogue of the sifted enzyme, since it is significantly cheaper than natural, but some producers use natural enzymes principally and this trend is increasing. The purpose of our work was to determine the rates of extraction of pygus enzymes from calf sichugas for the use of different ratios of organic (dairy) and inorganic (hydrochloric) acids in the extractant. The research was conducted in 2 stages. At the first stage, the extraction of enzymes from the homogenate of the sichugas was studied for the use of extractants with different content of hydrochloric acid. In the second stage of the research, the effect of the presence of a solution of lactic acid in the extract on the parameters of elimination of enzymes from the sichugum homogenate was detected. The highest concentration of protein 89,8 mg/l was the fifth experimental group, where 0,25 cm³ of lactic acid solution was added, which was 34,5 % higher than the similar group from the 1 st stage of the research.

Key words: extraction of enzymes, extractant, peach enzymes, spectrophotometry, elimination, sichug homogenate.

ДІЯ ЕКСТРАГЕНТІВ НА ПОКАЗНИКИ ЕЛІМІНАЦІЇ СИЧУЖНИХ ЕНЗИМІВ**С. В. Мерзлов, В. Ю. Білий, А. В. Риндін**

e-mail: Valentuna.Bila@ukr.net

Білоцерківський національний аграрний університет

Соборна площа, 8/1, м. Біла Церква, Київська обл., 09117, Україна

Сичужні ензими є невід'ємною частиною технології м'яких сирів, тому ринок потребує значної кількості ензимних препаратів, адже останні дослідження свідчать, що споживання сичужних сирів в Україні зростає. Важливим аспектом також є те, що майже всі промислові молокопереробні підприємства використовують мікробний аналог сичужних ензимів, адже він є значно дешевшим від природного, проте деякі виробники принципово використовують натуральні ензими і дана тенденція зростає. Завданням нашої роботи було встановити показники екстракції сичужних ензимів із сичугів телят за використання різного співвідношення органічної (молочної) та неорганічної (соляної) кислот у складі екстрагенту. Дослідження проводилися у 2 етапи. На першому етапі вивчали показники екстракції ензимів із гомогенату сичугів за використання екстрагенту із різним вмістом соляної кислоти. У другому етапі досліджень було виявлено вплив присутності розчину молочної кислоти у екстракті на показники елімінації ензимів із гомогенату сичугів. Найвищу концентрацію білка 89,8 мг/л мала п'ята дослідна група, де додавали 0,25 см³ розчину молочної кислоти, що на 34,5 % переважала аналогічну групу з I етапу досліджень.

Ключові слова: екстракція ензимів, екстрагент, загальний білок, спектрофотометрія, елімінація, гомогенат сичугів.

Постановка проблеми

За технології сирів як в Україні, так і за кордоном застосовують сичужні ензими, які за походженням поділяються на дві групи. Сировиною для першої групи є натуральні сичуги козенят, ягнят і телят. Ензими другої групи одержують за допомогою мікроорганізмів. Застосування ензимів мікробного походження

може негативно впливати на сенсорні показники сирів. Крім того, останнім часом зростає попит на сири, виготовленні із застосуванням натуральних сичужних ензимів. У багатьох випадках виробництво сичужних ензимів із біоматеріалу проходить традиційним способом. Для екстракції ензимів використовують різні розчини. Залишається не вивченим питання використання

екстрагентів виготовлених за участі соляної та молочної кислот.

Аналіз останніх досліджень та публікацій

Важливим завданням сучасної біотехнології є розробка наукових основ та рішень для одержання продуктів, що мають широкі перспективи практичного використання. Одне з провідних місць серед них належить ензимам тваринного походження, які застосовують у різних галузях народного господарства [1–3]. Сичужні ензими використовують для виробництва сичужних сирів, які є високопоживними білковими продуктами, одержані з молока шляхом його зсідання і оброблення. Сири зберігають всі основні поживні речовини молока, за винятком вуглеводів. Сичужні ензими отримують шляхом екстракції з власне шлунка телят, які харчувалися лише молоком і молочними продуктами [5, 19]. Екстракт сичужних ензимів очищають за допомогою фільтрації, а потім пропускають через бактеріальний фільтр і зберігають у стерильних умовах. Двома активними білковими компонентами телячих ензимів є хімозин і пепсин, стандартне співвідношення яких – 80 % до 20 %, відповідно. Активність сичужних ензимів залежить від чинників технологічних умов їх виробництва [16, 17]. У дослідженнях В. В. Єльчанінова (2012 р.) технологія виробництва молокозсідального ензимного препарату передбачає підготовку вихідної сировини, його гомогенізацію, внесення в гомогенізовану сировину екстрагента, екстракцію, відстоювання отриманої суміші до поділу її на рідку фазу і осад, виділення сичужного ензиму і його подальшу обробку. Перед внесенням екстрагента в гомогенізовану сировину в екстрагент вносять сульфат амонію в кількості 7,5–10 %. Внесення сульфату амонію призводить до того, що процес екстракції протікає одночасно з процесом флокуляції, обсяг фільтрату збільшується, а втрати ензиму зводяться до мінімуму [4–5]. За даними Ю. Я. Свириденка (2011 р.) удосконалено спосіб виробництва сичужного ензиму, що включає подрібнення сичугів, екстракцію ензимів розчином хлористого натрію, внесення консерванту бензоату натрію для запобігання бактеріального росту, відділення рідкої фази, фільтрування. Екстракцію ензимів проводять одноразово 3,0–10,0 % розчином хлористого натрію за температури 35–40 °С протягом 3–3,5 години без додаткового доведення рН за

повільного, постійного перемішування, екстрактним відокремлюють від сировини, здійснюють активацію сичужних ензимів в екстракті шляхом доведення рН 4,6–4,7 і витримки його протягом 8–16 годин за температури 25–35 °С. Активованій екстракт обробляють речовинами, які полегшують і прискорюють процес фільтрування, фільтрують під тиском 0,015–0,02 МПа за температури 20–25 °С. Отримані ензими стабілізують шляхом внесення в фільтрат сухого хлористого натрію до вмісту його в готовому препараті 17–18 %, і доведення рН готового препарату до 5,3–7,0 розчином гідроксиду натрію, а консервант бензоату натрію вносять на стадії стабілізації до вмісту його в готовому препараті 0,1–0,5 %. Для більш повної елімінації ензимів можливе повторне екстрагування. Другу екстракцію проводять розчином хлористого натрію в тих же умовах, при цьому, обсяг розчину хлористого натрію знижують втричі, щоб уникнути розбавлення препарату [7–9]. Сичужний або інші молокозсідальні ензими викликають протеолітичне розщеплення казеїнаткальційфосфатного комплексу і формування просторової структури сирного згустку [13–16]. В літературі не описано поєднання кислот у складі екстрагентів, що має науково-практичний інтерес.

Мета, завдання та методика досліджень

Метою роботи є встановлення показників екстракції сичужних ензимів із сичугів телят за використання різного співвідношення органічної (молочної) та неорганічної (соляна) кислот у складі екстрагента.

Дослідження проводилися у 2 етапи. На першому етапі вивчали показники екстракції ензимів із гомогенату сичугів за використання розчину екстрагентів із різним вмістом соляної кислоти (табл. 1). До 0,2 г гомогенату сичуга у всіх дослідних групах додавали по 10,0 мл дистильованої води.

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

Таблиця 1. Схема I етапу досліджу

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
I дослідна	0,2 ± 0,002	10,0	-
II дослідна	0,2 ± 0,001	10,0	0,2
III дослідна	0,2 ± 0,003	10,0	0,4
IV дослідна	0,2 ± 0,004	10,0	0,6
V дослідна	0,2 ± 0,003	10,0	0,8
VI дослідна	0,2 ± 0,002	10,0	1,0

У другому етапі досліджень встановлювали вплив присутності розчину молочної кислоти у екстрагенті на показники елімінації ензимів із гомогенату сичугів. До проб додавали однакову кількість дистильованої води по (10,0 см³) та соляної кислоти (0,8 см³), табл. 2.

До суміші гомогенатів сичугів із соляною кислотою і дистильованою водою із I дослідної групи проб вносили 0,008 см³ 40 % розчину молочної кислоти. Суміші із II – VI дослідних груп містили по 0,10 – 0,30 см³ молочної кислоти. Екстракцію ензимів проводили протягом 12 год. за температури +5°C. Перед спектрофотометрією

проводили очищення екстракту за допомогою центрифуги за частоти обертів 7–8 тис. об. хв протягом 10 хвилин, потім екстракт проціджували і повторно центрифугували протягом 5 хвилин. Таким чином, у ході проведення досліджень було встановлено, що найвищі показники за концентрацією білка мала V дослідна група, де в якості екстрагента використовували 0,8 см³ розчину соляної кислоти. Тому в II етапі досліджень в усіх групах для екстракції використовували 0,8 см³ розчину соляної кислоти (контрольна група), а в дослідних у різних дозах додавали розчин молочної кислоти.

Таблиця 2. Схема II етапу досліджу

Група проб	Маса гомогенату сичугів в одній пробі, г	Об'єм дистильованої води в одній пробі, см ³	Об'єм розчину соляної кислоти, см ³	Об'єм розчину молочної кислоти, см ³
I дослідна	0,2 ± 0,004	10,0	0,8	0,08
II дослідна	0,2 ± 0,003	10,0	0,8	0,10
III дослідна	0,2 ± 0,001	10,0	0,8	0,15
IV дослідна	0,2 ± 0,002	10,0	0,8	0,20
V дослідна	0,2 ± 0,003	10,0	0,8	0,25
VI дослідна	0,2 ± 0,002	10,0	0,8	0,30

Результати досліджень

Встановлено, що від вмісту соляної кислоти у екстракті залежить показник елімінації білків – ензимів (I етап досліджень) за використання 0,2 см³ 6Н розчину HCl (II дослідна група проб) вміст білків, в тому числі сичужних ензимів збільшився

на 18,1 % порівняно із I дослідною групою де екстракцію проводили без участі кислоти. Внесення до 0,2 г гомогенату сичугів 0,4–0,6 см³ розчину соляної кислоти дозволило підвищити вміст елімінованих ензимів у пробах на 25,3–31,0 % порівняно із показниками першої дослідної групи. Найвищий показник екстракції був

виявлений у V дослідній групі, різниця із I дослідною групою становила 36,4 %. Підвищення об'єму 6Н розчину соляної кислоти до 1,0 см³ на 0,2 г гомогенату сичугів не дало позитивного результату у порівнянні із показниками екстракції

у V дослідній групі. Поясненням цього може бути те, що збільшення вмісту кислоти негативно впливає на оптимум створення ізоелектричної точки.

Таблиця 3. Рівень екстракції ензимів за концентрацією загального білка, мг/л

Група проб	I етап досліджень	II етап досліджень
I дослідна	28,0 ± 1,14	43,2 ± 1,02
II дослідна	33,1 ± 1,07	52,2 ± 1,16
III дослідна	35,1 ± 1,24	65,4 ± 1,03
IV дослідна	36,7 ± 1,117	72,1 ± 1,14
V дослідна	38,4 ± 1,14	89,8 ± 1,24
VI дослідна	37,2 ± 1,12	78,6 ± 1,44

Експериментально доведено, що показники елімінації у II етапі досліджень за вмістом білка були більшими, ніж у I етапі досліджень. Порівнюючи показники екстракції у I дослідній групі виявлено, що застосування суміші кислот призводить до підвищення даного показника у II етапі досліджень.

Аналізуючи показники вмісту білків ензимів у розчинах одержаних у II етапі досліджень виявлено, що застосування 0,1 та 0,18 см³ молочної кислоти (II та III дослідних груп) супроводжується зростанням показника елімінації ензимів на 20,8 % та 51,4 %, відповідно, відносно I дослідної групи. Найвищий показник елімінації білків був у V дослідній групі, він переважав дані I дослідної групи у 2,07 раза. Підвищення вмісту молочної кислоти у суміші до 0,3 см³ на 0,2 г гомогенату сичугів телят супроводжувалось зниженням показника елімінації відносно V дослідної групи. Тому можна вважати, що поєднання розчинів органічних кислот покращує екстракцію.

Висновки та перспективи подальших досліджень

Присутність у екстрагенті соляної кислоти (0,8 см³ 6Н HCl на 0,2 г гомогенату сичугів телят розчиненого в 10 см³ дистильованої води) дає змогу екстрагувати 38,4 мг/л білків, у тому числі сичужних ензимів на 1 л екстрагента.

За поєднання соляної і молочної кислот показники екстракції зростають у 2,3 раза.

Подальші наукові дослідження будуть направлені на вивчення та удосконалення методів екстракції ензимів, використання інших

органічних екстрагентів та дослідження готової продукції.

Referens

1. Gurung, N., Ray, S., Bose, S. & Rai V. (2013). Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond. *Biomed. Res. Int.*, 2013, 1–18.
2. Venher, O. O. & Mishchenko, H. V. (2011). Vykorystannia proteolitychnykh fermentiv dlia nadannia tkanynam, shcho mistiat vovnu, stiikoho miakoho hryfu [The use of proteolytic enzymes to provide tissues that contain wool, a stable soft mold]. *Vostochno-Evropeyskiy zhurnal peredovykh tekhnologiy*, 3/6 (51), 42–44 [in Ukrainian].
3. Karpenko, O. V. (2015). Naukovi zasady stvorennia biotekhnolohii poverkhevoaktyvnykh rehovyn z polifunktsionalnymy vlastyvostiamy [Scientific principles of biotechnology development of surface-active substances with polyfunctional properties]. (Avtoreferat dysertatsii doktora tekhnichnykh nauk). Natsionalnyi universytet kharchovykh tekhnolohii, Kyiv [in Ukrainian].
4. Elchaninov, V. V. & Koval, A. D. (2012). Patent Rossiyskoy Federatsii 2467068. Moskva: Federalnaya sluzhba po intellektualnoy sobstvennosti [in Russian].
5. Gorbatova, K. K. (1984). Biokhimiya moloka i molochnykh produktov [Biochemistry of milk and dairy products]. Moskva: Legkaya i pishchevaya promyshlennost. sobstvennosti [in Russian].
6. Ardo, Y., Thange, B. V. & Madsen J. S. (2002). Dynamics of freeamino acid composition in cheese ripening. *Aust. J. Dairy Technol.*, 57, 109–115.

7. Chaharovskiy, O. P., Tkachenko, N. A. & Lysohor, T. A. (2013). Khimiia molochnoi syrovyny [Chemistry of dairy raw materials]. Odesa : Simeks-print [in Ukrainian].
8. Krus, G. N. (1992). K voprosu stroyeniya mitsellykazeina i mekhanizma sychuzhnoy koagulyatsii kazeina [On the structure of micelle casein and the rennet mechanism casein coagulation]. *Molochnaya promyshlennost*, 4, 23–28 [in Russian].
9. Krus, G. N. (1990). Kontseptsiya sychuzhnoy koagulyatsii kazeina [Casein Rennet Coagulation Concept]. *Molochnaya promyshlennost*, 6, 43–45 [in Russian].
10. Saldo, J., McSweeney, P. L. H. & Sendra E. (2002). Proteolysis in caprine milk cheese treated by high pressure to accelerate cheeseripening. *International Dairy Journal*, 12 (1), 35–44.
11. Gaiaschi, A., Beretta, B. & Poiesi, C. (2000). Proteolysis of α S-casein as a marker of Grana Padano cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, 83 (9), 2733–2739.
12. Ozturk, M., Govindasamy-Lucey, S., Jaeggi, J. J., Johnson, M. E., Lucey J. A. (2015). Low-sodium Cheddar cheese: Effect of fortification of cheese milk with ultrafiltration retentate and high-hydrostatic pressure treatment of cheese. *Journal of Dairy Science*, 98, 6713–6726.
13. Park, W. Y. (2001). Proteolysis and Lipolysis of Goat Milk Cheese. *Journal of Dairy Science*, 84 (E. Suppl.), E84–E92.
14. Tsisaryk, O. I., Slyvka, I. M. & Bilyk, O. Ya. (2013) Analiz mikrobiolohichnoho skladu ovechoho syru [Analysis of the microbiological composition of sheep cheese]. *Aktualni problemy kharchovoi promyslovosti : materialy Vseukrainskoi naukovo –tekhnichnoi konferentsii* (pp. 146–147). Ternopil [in Ukrainian].
15. Rogov, I. A., Titov, E. I. & Tikhomirova, N. A. (2006). Nanotekhnologiya biologicheskii aktivnykh belkov moloka perspektivnoye napravleniye pererabotki molochnoy syvorotki [Nanotechnology of biologically active milk proteins -perspective direction of whey processing]. *Sovremennyye napravleniya pererabotki syvorotki: sbornik materialov mezhdunarodnogo nauchno–prakticheskogo seminar* (pp. 61–62). Moskva: Obrazovatelnyy NTTs molochnoy promyshlennosti [in Russian].