

УДК 664.951.037.5.014 : 543

## Биохимическая оценка степени расщепления белков тканей гидробионтов

Д.И. Пискунович<sup>1</sup>, В.А. Мухин<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Технологический факультет МГТУ, кафедра технологий пищевых производств*

<sup>2</sup> *Биологический факультет МГТУ, кафедра биохимии*

**Аннотация.** В работе представлена оценка эффективности различных методов определения степени деградации белков. Выявлены наиболее оправданные методы оценки качества белковой составляющей рыбного сырья – гель-фильтрации в сочетании с определением аминного азота. Сделаны выводы о целесообразности их использования в технологической практике при выявлении недоброкачественного сырья и продукции.

**Abstract.** In the paper the estimation of efficiency for various methods of degree of proteins degradation for the purpose of their further use in technological practice has been presented. The conclusions about the appropriateness of these methods for identifying substandard raw materials have been made.

**Ключевые слова:** качество, объективные показатели, степень гидролиза, денатурация белка, субстрат, гидролизат, аминный азот, общий азот, свободные аминокислоты, водорастворимые белки, низкомолекулярные пептиды, оптическая плотность растворов  
**Key words:** quality, objective indicators, hydrolysis degree, melting of proteins, substratum, hydrolyzate, amine nitrogen, general nitrogen, free amino acids, water-soluble proteins, low-molecular peptides, optical density of solutions

### 1. Введение

В настоящее время рыбная промышленность продолжает широко использовать в большинстве технологических процессов для оценки качества продукции субъективный органолептический метод контроля. Органолептические характеристики включены в нормативно-техническую документацию на сырье и готовую продукцию, где большинство показателей качества характеризуется описательной терминологией, допускающей возможность широкого толкования формулировок (*Лукина и др.*, 1990).

Биохимические показатели качества рыбопродукции содержатся лишь в отдельных нормативных документах, при этом уверенно определить влияние отдельного показателя на качество рыбы не всегда представляется возможным, т.к. наряду с возрастанием одного показателя, часто имеет место убывание другого или нескольких других, и поэтому понять, какой из показателей как влияет на качество рыбы, довольно затруднительно (*Притыкина*, 2005).

Известно, что в процессе хранения происходят значительные изменения белкового компонента, от глубины этих изменений зависит пищевая ценность. Определяющим процессом в ходе гидролиза белков является накопление низкомолекулярных продуктов белковой деградации. Как правило, происходит ферментативный распад под воздействием собственных протеиназ, а также протеолитических ферментов размножающихся микроорганизмов. Это классические ферментативные процессы, и их интенсивность зависит от нескольких основных факторов: температуры гидролиза, pH реакционной среды, химического сродства ферментного препарата и субстратных белков, соотношения количества фермента и субстрата в реакционной смеси, продолжительности гидролиза и т.д. (*Мухин, Пискунович*, 2011). По мнению биохимика Мосолова В.В., зависимость скорости и глубины ферментативной реакции определяется, прежде всего, природой фермента и незначительно зависит от типа используемого субстрата (*Мосолов*, 1971).

Нами были изучены зависимости скорости и глубины гидролиза белков, входящих в состав сырья, от перечисленных факторов.

Действующая нормативная документация регламентирует не в полной мере показатели качества для некоторых видов продукции, поэтому мы полагаем, что определение объективных показателей качества белковой составляющей рыбной продукции представляет собой весьма актуальную задачу.

### 2. Объекты, методы и результаты исследований

В настоящей работе нами была предпринята попытка оценить эффективность различных методов определения степени распада (деградации) белков с целью дальнейшего их использования в технологической практике.

При проведении анализов выполнялось 3-5 параллельных измерений. Содержащиеся в рисунках и таблицах данные представляют собой средние величины определяемых значений. Статистическую обработку результатов измерений проводили общепринятыми методами при доверительной вероятности  $p = 0,05$  (Дерфель, 1994).

В качестве модельного субстрата мы использовали различное белоксодержащее сырье, которое в настоящее время используется недостаточно эффективно: некондиционную северную креветку *Pandalus borealis*, отходы переработки камчатского краба *Paralithodes camtschaticus* и мягкие ткани (отходы переработки) исландского гребешка *Chlamys islandicus*.

Исходное сырье характеризуется низким содержанием липидов и значительным содержанием белков, причем в некондиционной креветке последний показатель более чем в 2 раза превышает таковой для отходов переработки краба. Химический состав сырья представлен в табл. 1.

Таблица 1. Химический состав сырья (массовая доля, %)

Показатели	Некондиционная северная креветка ("лом")	Отходы переработки камчатского краба (ОПКК)	Отходы переработки исландского гребешка (ОПГ)
Вода	76,8	68,1	81,8
Зола	2,4	17,0	2,2
Липиды	1,2	0,9	0,1
Белки	18,1	8,5	15,9
Хитин	1,5	5,5	–

В качестве белоксодержащего сырья в работе также использовали различные малоценные объекты промысла (сайка, путассу, морской петух, кукумария, звездчатый скат) и коммерческие белковые гидролизаты из рыбной муки (ОАО "Протеин") и отходов филетирования судака (ОАО "Гипрорыбфлот- ЭКОС").

В ходе многолетних исследований в Полярном научно-исследовательском институте морского рыбного хозяйства и океанографии им. Н.М. Книповича (ПИНРО), в лаборатории биохимии, была проведена разработка технологий получения белковых ферментативных гидролизатов различного назначения: для микробиологических питательных сред, для кормовых и пищевых целей. В качестве фермента нами был использован препарат, полученный из гепатопанкреаса камчатского краба, отличающийся высокой активностью и широкой субстратной специфичностью (Мухин, Новиков, 2001).

Одной из частных проблем в разработке технологии получения ферментативных белковых гидролизатов является объективная оценка эффективности расщепления белкового субстрата.

Одним из критериев данной оценки считается степень гидролиза, которая определяется различными способами. Наиболее распространенным показателем является отношение массовой доли аминокислотного азота к массовой доле общего азота в гидролизате (Артюхин и др., 1990).

Некоторые авторы используют в качестве понятия степени гидролиза белков массовую долю небелкового азота в общем азоте или количество растворимых белковых веществ (Ярочкин и др., 1997).

В процессе нашего исследования мы обращались к разным способам оценки гидролизруемости субстратов в зависимости от тех целей, которые преследовались в каждом конкретном случае.

Для качественной сравнительной оценки гидролизующести субстратов мы применяли известный спектрофотометрический метод ( $D_{280}$ ). Этот метод имеет высокую чувствительность и удобен при работе с разбавленными растворами гидролизатов в условиях лабораторных экспериментов с малыми массами образцов.

Таблица 2. Соотношение содержания небелкового и аминокислотного азота в различных гидролизатах

Гидролизат	$N_{нб}$	$N_{ам}$	$N_{ам}/N_{нб}$
ОПКК	7,46	3,70	49,60
ОПГ (гидролизат для кормов)	3,93	1,92	48,85
Кукумария	7,77	3,60	46,33
Отходы переработки судака ("Гипрорыбфлот-ЭКОС")	8,40	4,20	50,00
Панкреатический гидролизат рыбной муки	8,65	4,08	47,17
ОПГ	9,66	4,55	47,10
ОПК	11,82	6,12	51,78
Среднее соотношение $N_{ам}/N_{нб}$			48,70

Однако при оценке соответствия получаемых гидролизатов требованиям технических условий и

сравнении их с коммерческими препаратами мы использовали определение небелкового и аминного азота, по которым рассчитывали степень гидролиза. Соотношение содержания небелкового и аминного азота в различных гидролизатах представлены в табл. 2.

Сравнение содержания аминного и небелкового азота в различных объектах исследований показало, что эти параметры очень хорошо коррелируют друг с другом. Коэффициент линейной корреляции составил 0,996. Это означает, что величины  $N_{ам}$  и  $N_{нб}$  являются зависимыми. Зависимость массовой доли аминного азота в гидролизатах из различных гидробионтов от массовой доли небелкового азота представлена на рис. 1. По расчетам, массовая доля аминного азота составляет около 49 % от небелкового.

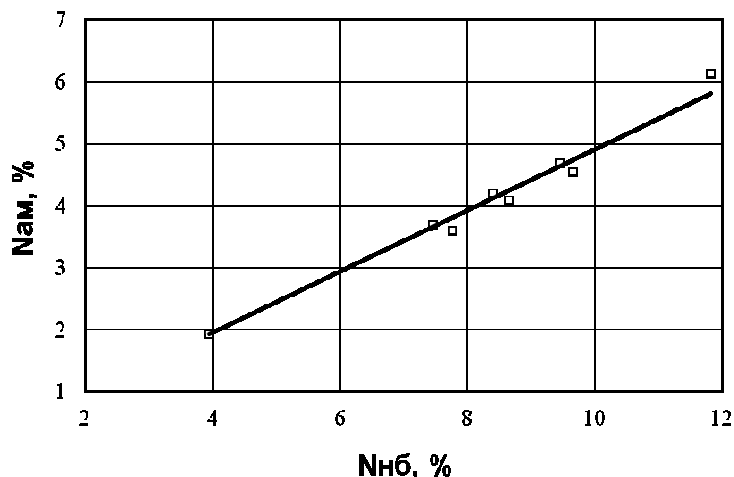


Рис. 1. Зависимость массовой доли аминного азота в гидролизатах из различных гидробионтов от массовой доли небелкового азота

Для более точного расчета глубины гидролиза мы рассмотрели также зависимости степени гидролиза и содержания свободных аминокислот (САК) от массовой доли  $N_{ам}$ , которые приведены на рис. 2.

Зависимость степени гидролиза ( $P$ ) от содержания аминного азота линейна с высоким коэффициентом корреляции и практически проходит через нулевые значения. Зависимость содержания САК от содержания аминного азота также линейна, но пересекает ось абсцисс при значении  $N_{ам} = 0,72 \%$ , что соответствует  $P = 8,94 \%$ . Это означает, что даже при полном отсутствии САК в образце содержатся свободные аминокислоты пептидов и белков.

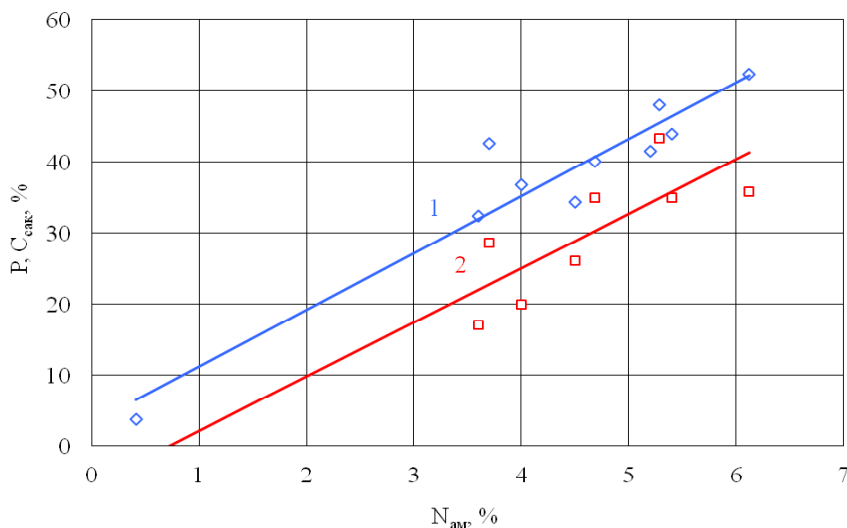


Рис. 2. Зависимость степени гидролиза (1) и массовой доли свободных аминокислот (2) от массовой доли аминного азота в различных гидролизатах

Содержание общего, аминного азота и свободных аминокислот в различных гидролизатах приведены в табл. 3. Случайные величины R и САК являются зависимыми от  $N_{ам}$ , т.к. коэффициент линейной корреляции существенно отличен от нуля и составляет 0,951 и 0,774 соответственно.

Таблица 3. Содержание общего, аминного азота и свободных аминокислот в различных гидролизатах

Исходное сырье	$N_{об.}, \%$	$N_{ам.}, \%$	$P = N_{ам} / N_{об.}, \%$	САК, %
Морской огурец	11,1	3,60	32,43	17,03
Морской петух	13,1	4,50	34,35	26,17
Звездчатый скат	10,9	4,00	36,70	19,98
Некондиционная креветка	11,7	4,68	40,00	34,97
Путассу	12,5	5,20	41,43	34,23
Отходы переработки камчатского краба	8,7	3,70	42,53	28,70
Отходы переработки исландского гребешка	12,3	5,40	43,90	34,90
Сайка	11,0	5,28	48,00	43,30

Для определения молекулярно-массового распределения белковых веществ в гидролизатах мы использовали метод гель-фильтрации на колонке сефадекса G-100 (диапазон разделения от 4 до 150 кД).

Профиль элюции водорастворимых белковых компонентов, содержащихся в ОПГ, представлен на рис. 3. В результате наших исследований обнаружено более высокое содержание низкомолекулярных пептидов и общей суммы водорастворимых белковых компонентов в гидролизатах по сравнению с исходным сырьем. В частности, в гидролизате с высокой степенью расщепления белков (для микробиологических целей) содержание низкомолекулярных пептидов с молекулярной массой (ММ) менее 4 кД и водорастворимых белковых компонентов, по сравнению с исходным сырьем, было выше в 5,44 и 5,13 раза соответственно (табл. 4). Кормовой гидролизат по этим показателям занимает промежуточное положение.

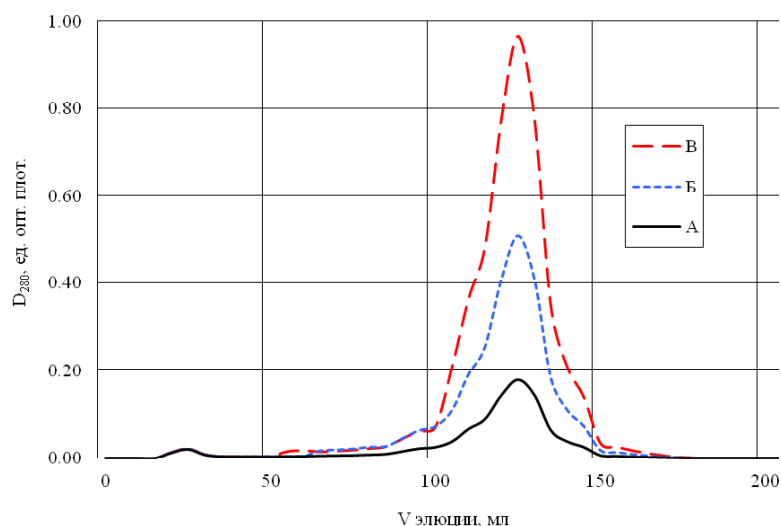


Рис. 3. Профиль элюции водорастворимых белковых компонентов, содержащихся в ОПГ без гидролиза (А), в гидролизате ОПГ для кормов (Б) и в гидролизате ОПГ для микробиологических сред (В). Колонка сефадекса G-100 (1,4 X 70 см), скорость элюции 20 мл/ч

Таблица 4. Соотношение водорастворимых веществ белковой природы в исходном сырье и гидролизатах, полученных из него

Исходное сырье	Условия гидролиза	Фракции белковых веществ, %			
		> 150 кД	150 кД – 4 кД	< 4 кД	Водорастворимых белковых веществ
Измельченные ОПГ	Без гидролиза	100,0	100,0	100,0	100,0
Кормовой гидролизат ОПГ	1,5 часа 2 г ФП/1 кг сырья	106,4	324,2	290,2	286,8
Микробиологический гидролизат ОПГ	6 часов 6 г ФП/1 кг сырья	108,7	281,7	543,8	512,7

Еще одним наглядным способом отражения степени деструкции белков следует считать изменение оптической плотности растворов за счет низкомолекулярных пептидов, неосаждаемых трихлоруксусной кислотой (ТХУ). Известно, что в 10%-ном растворе ТХУ выпадают в осадок белковые соединения с ММ более 2 кД (Семенов, 1988).

В процессе исследований мы часто обращались к этому способу оценки эффективности гидролиза. В качестве примера на рис. 4 показаны спектры поглощения растворов кормовых и микробиологических гидролизатов ОПГ, а также негидролизованых ОПГ в УФ-области.

Очевидно, что оптическая плотность в этой области значительно выше для гидролизатов, по сравнению с исходным сырьем. Количественной оценкой в данном случае является разница значений  $D_{280}$  и  $D_{320}$  ("фон").

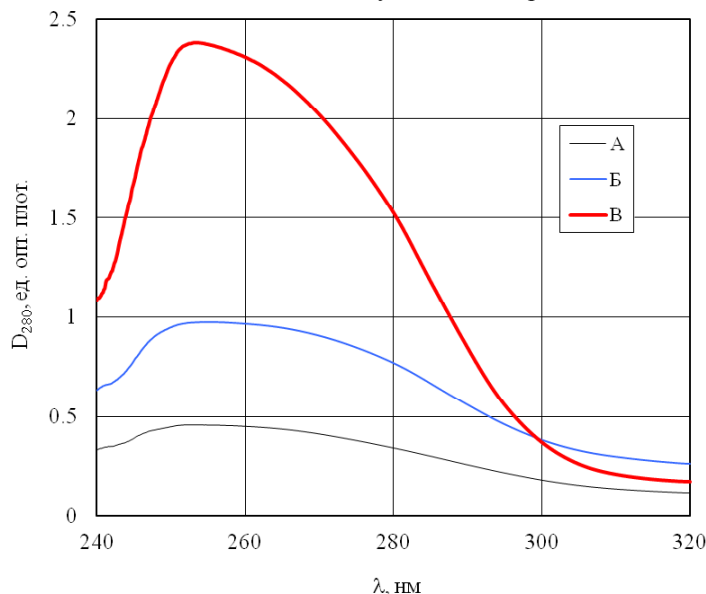


Рис. 4. Спектры поглощения в УФ-области ТХУ-неосаждаемых белковых компонентов, содержащихся в ОПГ без гидролиза (А), в гидролизате ОПГ для кормов (Б) и в гидролизате ОПГ для микробиологических сред (В). Сухие гидролизаты разбавлены в 1250 раз

Данные примеры показывают, что определение соотношения низко- и высокомолекулярных фракций, а также определение концентрации ТХУ-неосаждаемых белковых соединений весьма объективно отражают степень и глубину гидролиза белков исходного сырья. Таким образом, эффективность распада белков в различном сырье может быть оценена различными способами. Каждый из описанных методов имеет свои недостатки и преимущества, которые представлены в табл. 5.

Таблица 5. Характеристика методов оценки эффективности протеолитического расщепления белоксодержащих субстратов

Наименование метода	Недостатки	Преимущества
Гравиметрический	Учитывает прирост сухого вещества, как за счет белковых соединений, так и за счет солей и др.	Простота и скорость
Определение $N_{ам}$ , $N_{нб}$	Значения могут быть завышены за счет содержания карбамида, аммиака и др.	Методика по ГОСТу
Определение САК	Данные могут быть занижены, когда соотношение $N_{ам}$ (пептидов) $N_{ам}$ (САК) слишком мало. Очень трудоемкий метод	Наиболее объективный метод
Гель-фильтрация	Основан на поглощении при 280 нм, т.е. на содержании только ароматических аминокислот, а оно может быть непропорциональным. Очень длительный метод	Дает возможность определить соотношение высоко- и низкомолекулярных фракций белковых веществ
Спектральный анализ, после осаждения ТХУ	Основан на поглощении при 280 нм, т.е. на содержании только ароматических аминокислот, а оно может быть непропорциональным	Дает возможность определить содержание низкомолекулярных пептидов (ММ < 2 кД)

### 3. Заключение

Вероятно, не существует универсального показателя, который единственно объективно отражал бы глубину и степень деградации белков, поэтому мы считаем, что при детальном описании свойств белкового сырья необходимо приводить данные, полученные с применением различных методов. Такой подход позволяет не только определить степень расщепления белков, но и дает представление о фракционном составе веществ белковой природы, входящих в состав белоксодержащего продукта.

Результаты проведенных исследований позволяют сделать вывод о том, что при оценке качества белковой составляющей рыбного сырья весьма оправдано использование метода гель-фильтрации в сочетании с определением аминного азота. Данные методы дают возможность максимально объективно выявить недоброкачественность сырья до того, как об этом смогут свидетельствовать субъективные органолептические показатели.

### Литература

- Артюхин В.И., Шепелин А.П., Киселева Н.В.** Белковые гидролизаты в производстве питательных сред: Производство и применение продуктов микробиологических производств. М., ВНИИСЭНТИ Минмедпрома СССР, вып. 9-10, 52 с., 1990.
- Дерфель К.** Статистика в аналитической химии. М., Мир, 268 с., 1994.
- Лукина Л.Г., Бобровская И.В., Панчешенко Т.И.** О возможности объективной оценки качества свежевывловленной и мороженой рыбы. В сб.: *Прогрессивная холодильная технология пищевой продукции из гидробионтов*. Калининград, АтлантНИРО, с.168-175, 1990.
- Мосолов В.В.** Протеолитические ферменты. М., Наука, 413 с., 1971.
- Мухин В.А., Новиков В.Ю.** Ферментативные белковые гидролизаты тканей морских гидробионтов: получение, свойства и практическое использование. Мурманск, ПИНРО, 97 с., 2001.
- Мухин В.А., Пискунович Д.И.** Сравнительная оценка методов определения степени расщепления белков. V Российский симпозиум "Белки и пептиды": тез. докл. Петрозаводск, Ин-т биологии Карельского науч. центра РАН, с.214, 2011.
- Притыкина Н.А.** Обоснование дифференциации сортности мороженой рыбы на основе интегрального показателя качества. Дис. ... канд. техн. наук, Калининград, 186 с., 2005.
- Семенов С.М.** Пептоны, используемые в микробиологии. Производство и применение продуктов микробиологических производств. М., ВНИИСЭНТИ, вып. 4, 31 с., 1988.
- Ярочкин А.П., Чупикова Е.С., Кузнецов Е.Н., Градов Н.А.** Биотехнологическая утилизация белоксодержащих отходов рыбопереработки. Изв. ТИНРО-центра, т.120, с.44-48, 1997.