

УДК 577.152.3:664.95

В.Ю. Новиков, С.Р. Деркач, А.Ю. Широнина, В.А. Мухин

Кинетические закономерности ферментативного гидролиза белков тканей гидробионтов: эффект способа внесения фермента

V. Yu. Novikov, S.R. Derkach, A. Yu. Shironina, V.A. Mukhin

Kinetics of the enzymatic hydrolysis of hydrobiont tissue proteins: Effect of the enzyme introduction

Аннотация. Изучены кинетические закономерности ферментативного гидролиза тканей атлантической трески. Для проведения гидролиза (протеолиза) был использован ферментный препарат, полученный из гепатопанкреаса камчатского краба *Paralithodes camtschatica*. Разработан новый метод производства белкового гидролизата на основе многократного внесения ферментного препарата (через равные промежутки времени) в реакционную смесь. Показано, что этот метод гарантирует увеличение максимальной степени гидролиза. Разработана кинетическая модель, описывающая механизм ферментативного гидролиза рыбных белков по предлагаемой технологии. Модель основана на существовании легко расщепляемых и трудно расщепляемых белковых фракций. В рамках полученной кинетической модели рассчитаны константы скорости промежуточных стадий протеолиза. Отмечено увеличение содержания свободных аминокислот (в два раза) и дисперсности в гидролизатах, полученных при многократном внесении ферментного препарата в реакционную смесь, по сравнению с гидролизатами, полученными по традиционной схеме, предусматривающей его однократное внесение.

Abstract. Kinetic laws of enzyme hydrolyze for Atlantic cod tissues have been studied. Enzyme specimen produced from hepatopancreas of Kamchatka crab *Paralithodes camtschatica* was used for carrying out hydrolyzes (proteolysis). A new method of protein hydrolyzate production based on multiple enzyme injection (over equal time intervals) into a reactive system has been worked out. It has been shown that this method assures increase of maximum degree of hydrolyze. A kinetic model describing the mechanism for enzyme hydrolysis of fish protein in the proposed technology has been developed. The model is based on the existence of easily and hardly hydrolyzed protein fractions. In the frame of the obtained kinetic model, the second-order constants of intermediate stage rates of proteolysis have been calculated. The content of free amino acids increases 2-fold, and dispersity of aqueous dispersions increases for the hydrolysates obtained in the multiple injection process in comparison with hydrolyzate obtained in a traditional single-stage process.

Ключевые слова: белковый гидролизат, ферментативный гидролиз, аминокислоты, кинетическая модель

Key words: protein hydrolysate, enzyme hydrolyze, amino acids, kinetic model

1. Введение

Продукты, содержащие различные аминокислоты и их производные, в настоящее время широко используются в пищевой, микробиологической промышленности, медицине и в производстве комбикормов. Одно из ведущих мест среди таких продуктов занимают ферментативные белковые гидролизаты, получаемые из отходов переработки гидробионтов, в том числе рыбы, добываемой в морях и океанах. Мясо рыб богато незаменимыми аминокислотами, витаминами, микроэлементами и является полноценным сырьем для производства пищевых белковых гидролизатов (Mukhin, Novikov, 2001). Задача разработки эффективных технологий рыбных гидролизатов неразрывно связана с проблемой безотходного рационального использования морских биологических ресурсов, что чрезвычайно важно как с научной, так и с экономической точки зрения.

Получение гидролизатов основано на сложном биохимическом процессе – ферментативном гидролизе (протеолизе) белковых макромолекул и полипептидов. Протеолиз обеспечивает проведение процесса в мягких условиях и используется как альтернатива химическому (кислотному, щелочному) гидролизу. Ферментативный гидролизат представляет собой сложную дисперсную систему, состоящую из смеси водорастворимых олигопептидов и аминокислот (Рысакова и др., 2008).

Теоретические вопросы, связанные с изучением условий гидролиза белков, входящих в состав морских гидробионтов, обсуждаются в работах (Jens, 1982; Mukhin, Novikov, 2002; 2005). Исследованы зависимости скорости и глубины гидролиза белков тканей рыб от температуры и pH инкубационной

среды, количественного соотношения ферментного препарата и гидролизуемого сырья, продолжительности протеолиза. Глубина ферментативной реакции незначительно зависит от типа используемого субстрата (сырья) и определяется главным образом природой фермента (Неклюдов и др., 2000). Показано, что из всех исследованных ферментов ферментный препарат гепатопанкреатин, полученный из гепатопанкреаса (пищеварительной железы) камчатского краба *Paralithodes camtschaticus*, проявляет высокую субстратную специфичность по отношению к белкам морских организмов, в том числе рыб (*Dynamic light scattering...*, 1985; Vorob'ev, Goncharova, 1998).

Сложность построения физико-химической модели ферментативного протеолиза связана со спецификой процесса, в котором и субстрат и катализатор (фермент) являются биополимерами, обладающими определенными пространственными конформациями. С химической точки зрения интерес представляют прежде всего кинетические закономерности ферментативного гидролиза макромолекул белка и полипептидных цепей, определяемые как фермент-субстратным связыванием, так и межцепочечными взаимодействиями, экранирующими доступ фермента к пептидным связям. Существенное влияние на кинетику оказывает и явление автолиза – гидролиз белковых макромолекул самого фермента (Mukhin, Novikov, 2001). В настоящее время предпринимаются попытки компьютерного моделирования многостадийного процесса протеолиза на примере модельных глобулярных белков (Westemeier, 1993), при этом установление детального механизма ферментативного гидролиза белоксодержащих веществ остается нерешенной проблемой.

Целью работы являлось изучение кинетических закономерностей ферментативного гидролиза белоксодержащих субстратов (тканей атлантической трески) на примере протеолитических реакций с использованием ферментного препарата – гепатопанкреатина, а также эффектов, возникающих при различных способах введения ферментного препарата в реакционную среду.

2. Материалы и методы

2.1. Материалы

В качестве белоксодержащего сырья для получения белкового гидролизата методом ферментативного гидролиза использовали отходы переработки атлантической трески (головы, плавники, кости, мышечная ткань).

Ферментный препарат протеолитического действия – гепатопанкреатин – получен из гепатопанкреаса (пищеварительной железы) камчатского краба *Paralithodes camtschaticus* в лаборатории биохимии и технологии Полярного научно-исследовательского института морского рыбного хозяйства и океанографии имени Н.М. Книповича (ПИНРО) (Mukhin, Novikov, 2001; 2002). Протеолитическая активность препарата составляет 1.62 ед./мг (по отношению к 1%-му гемоглобину, рН 3.5). Гепатопанкреатин проявляет наибольшую активность в интервалах температур 50-55 °С и значений рН 7-9 инкубационной среды и обладает широкой субстратной специфичностью.

Химический и аминокислотный состав белоксодержащего сырья (отходов переработки трески) и ферментного препарата (гепатопанкреатина) приведены в табл. 1-3.

2.2. Получение гидролизата

Белоксодержащее сырье гомогенизировали (измельчали) до получения однородной массы. К сырью добавлялась дистиллированная вода в массовом соотношении 1:1. Смесь нагревалась до 50 °С и устанавливалась рН 7.5 для создания оптимальных условий гидролиза, обеспечивающих максимальную активность ферментного препарата. Ферментный препарат – гепатопанкреатин – вводили в реакционную смесь двумя способами. В первом случае гепатопанкреатин добавляли один раз в количестве 6 г/(кг сырья), во втором – ферментный препарат добавляли многократно через каждые 30 мин в процессе гидролиза по 6 г/(кг сырья).

Реакцию гидролиза проводили при непрерывном перемешивании в течение 6 ч, по истечении которых реакционную смесь нагревали до 100 °С в течение 20 мин для инактивации ферментного препарата.

После охлаждения гидролизат очищали от липидов и нерастворимых белковых фракций сепарированием. Для осаждения примесей в гидролизат вводили необходимый объем 1%-го раствора хитозана (в 0.1М HCl), устанавливали нейтральное значение рН 7.2±0.2, добавляя 18%-й раствор HCl, центрифугировали для удаления осадка. После фильтрования с использованием бумажных фильтров гидролизат сушили в лиофильной сушилке (сублимационная сушка) при –40 °С под вакуумом.

Таблица 1. Содержание микроэлементов в белоксодержащем сырье

Микроэлемент	Ni	Mn	Cu	Co	Cr	Fe	Zn	Cd
Содержание, мкг/(г сухого вещества)	5.00	4.22	2.25	1.77	1.74	0.07	0.04	0.01

Таблица 2. Химический состав белоксодержащего сырья и ферментного препарата

Элемент состава	Содержание, %			
	Треска атлантическая			Гепато-панкреатин
	Мышечная ткань	Кости	Мышечная ткань и кости (смешанный образец)	
Влага	81.2	75.0	77.1	8.5
Белок	17.4	15.2	15.9	90.0
Жир	0.2	0.4	0.8	0.7
Зола	1.2	9.0	5.0	0.8

Таблица 3. Аминокислотный состав белоксодержащего сырья

Аминокислота	Обозначение	Содержание, %
Валин	Val	5.9
Изолейцин	Ile	4.2
Лейцин	Leu	8.8
Лизин	Lys	8.1
Метионин	Met	2.6
Треонин	Thr	6.0
Триптофан	Trp	1.0
Фенилаланин	Phe	3.9
Аланин	Ala	8.6
Аргинин	Arg	3.3
Аспарагиновая	Asp	9.0
Гистидин	His	2.0
Глицин	Gly	8.6
Глутаминовая	Glu	14.4
Пролин	Pro	3.2
Серин	Ser	6.1
Тирозин	Tyr	3.1
Цистеин	Cys	1.2

2.3. Определение степени гидролиза

Степень гидролиза СГ, %, полученного ферментативного белкового гидролизата определяли по формуле

$$СГ = \left[\frac{N_{AA} - N_{AA_0}}{N_{OA} - N_{AA_0}} \right] 100 \% ,$$

где N_{OA} – содержание общего азота, %; N_{AA_0} – содержание аминного азота в негидролизованном сырье, %; N_{AA} – содержание аминного азота в гидролизате после гидролиза в течение некоторого периода времени, %.

Аминный азот определяли методом формольного титрования, содержание общего азота – по Кьельдалю. Концентрации общего и аминного азота в пробе, г/л, рассчитывали соответственно по формулам:

$$C_{AA} = N_{AA} \cdot 10\rho, \quad C_{AA_0} = N_{AA_0} \cdot 10\rho, \quad C_{OA} = N_{OA} \cdot 10\rho,$$

где ρ – плотность гидролизата, г/л.

2.4. Методы исследования

Определение молекулярно-массового состава гидролизатов проводили методом ПААГ-электрофореза (напряжение 600 В, сила тока 50 мА, мощность 30 Вт) при температуре 15 °С. В работе использовали полиакриламидный гель с градиентом 8-18 % [акриламида в разрешающем (resolving) геле]. В качестве буферных систем использовали трис-глициновый буферный раствор для электродных резервуаров и двукратный трис-глициновый буферный раствор для проб. Для окрашивания гелиевых пластинок применяли метод Кумасси (Мухин и др., 1999). Молекулярную массу разделенных белковых фракций определяли по калибровочному графику, построенному по данным фракционирования стандартных маркеров (*Pharmacia Biotech*), которые представляют собой белки с известной молекулярной массой.

Аминокислотный анализ и определение содержания свободных аминокислот в гидролизате выполняли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе *L-8800 (Hitachi, Япония)*. Анализ проводили в стандартном режиме анализа белковых гидролизатов, используя высокоэффективные ионообменные хроматографические колонки и специальный нингидриновый реагент для детектирования элюирующихся аминокислот. Разделение аминокислот осуществлялось на ионообменной колонке с использованием ступенчатого градиента натрий-цитратных буферных растворов возрастающего pH (*Moore et al., 1958; Pivnenko et al., 1997*).

Размер частиц в водных растворах (дисперсиях) гидролизатов определяли методом квазиупругого рассеяния света (фотонной корреляционной спектроскопии) на приборе *Malvern ZetasizerNanoZS (Malvern Instruments Ltd, США)*; источник света – гелий-неоновый лазер ($\lambda = 633$ нм), мощность источника света 5 мВт.

Содержание микроэлементов в белоксодержащем субстрате определяли методом атомно-абсорбционной спектроскопии на атомно-абсорбционных спектрофотометрах *AAnalyst-800 (Perkin Elmer, США)* и *AAS-30 (Carl Zeiss JENA, Германия)*. Пробоподготовка образцов для анализа включала сушку образцов в электрической муфельной печи при $t = 105$ °С до постоянной массы и последующее разложение с использованием системы микроволновой подготовки проб *Speedwave Four (Berghoff, Бельгия)* при $t = 200$ °С и $P = 40$ бар в течение 40 мин.

3. Влияние способа внесения фермента на кинетические параметры реакции гидролиза

Эффективность гидролитического расщепления белков (степень гидролиза) оценивали по накоплению аминного азота в гидролизате. На рис. 1 представлена зависимость содержания аминного азота от продолжительности процесса ферментативного гидролиза при различных способах внесения ферментного препарата: однократном (кривая 1) и многократном – через каждые 30 мин (кривая 2). Первоначально обработку экспериментальных данных (рис. 1) проводили в рамках формальной кинетики, предполагая, что реакция ферментализации является реакцией 1-го порядка (по продукту реакции – аминному азоту), в ходе которой фермент не расходуется. Формально реакция ферментативного гидролиза может быть описана кинетическим уравнением 1-го порядка, поскольку один из реагентов (вода) находится в избытке и его концентрация практически не меняется в ходе реакции.

При этом увеличение концентрации аминного азота во времени описывается уравнением

$$C_{AA} = C_{OA}(1 - e^{-kt})$$

или

$$-\ln(C_{OA} - C_{AA}) + \ln C_{OA} = kt,$$

где k – константа скорости реакции, c^{-1} ; t – время, с.

Формула с учетом поправки на содержание аминного азота в негидролизованном сырье имеет вид:

$$-\ln[(C_{OA} - C_{AA_0}) - (C_{AA} - C_{AA_0})] + \ln[C_{OA} - C_{AA_0}] = kt. \quad (1)$$

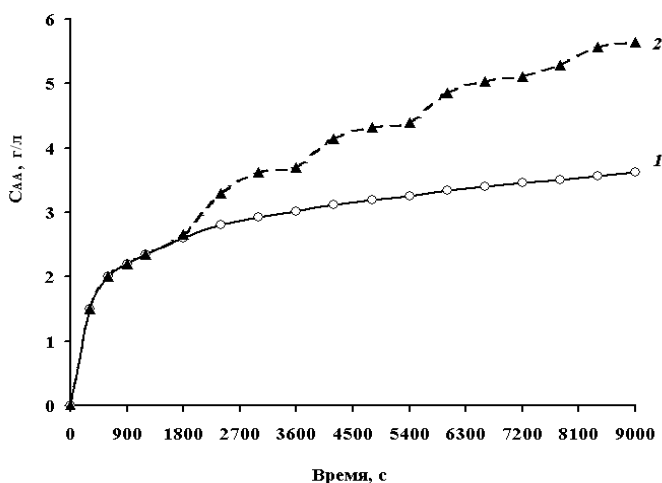


Рис. 1. Накопление аминного азота в гидролизате в зависимости от времени гидролиза белоксодержащего сырья при внесении гепатопанкреатина: 1 – однократным; 2 – многократным: количество фермента при каждом внесении – 6 г/(кг сырья); $t = 50$ °С; pH 7.5

Значения скорости и константы скорости реакции ферментолиза, рассчитанные по уравнению 1-го порядка (1), приведены в табл. 4.

Таблица 4. Значения скорости [$V_i \cdot 10^4$, г/(л·с)] и константы скорости ($k_i \cdot 10^4$, с⁻¹) реакции ферментолиза в текущий момент времени i , осуществленного с помощью разных способов введения гепатопанкреатина

Способ внесения фермента	0-0.5 ч		0.5-1 ч		1-1.5 ч		1.5-2 ч		2-2.5 ч	
	V_0	k_1	V_{30}	k_2	V_{60}	k_3	V_{90}	k_4	V_{120}	k_5
Одноразовый	4.77	1.75	2.14	0.57	1.76	0.42	1.61	0.35	1.47	0.30
Множественный	4.77	1.75	5.57	1.27	5.20	0.99	5.45	0.87	5.29	0.78

Очевидно, что константа скорости k_1 на начальном временном участке и начальная скорость V_0 реакции, катализируемой гепатопанкреатином, при фиксированном количестве фермента и субстрата одинаковы в обоих случаях. При использовании одноразового способа внесения ферментного препарата скорость реакции со временем падает и практически стремится к нулю через 6 ч гидролиза. Максимальная степень гидролиза составляет 40-45 %. В случае многократного внесения фермента скорость реакции в зависимости от времени понижается по сравнению с начальной, но незначительно. Как видно из рис. 1, она немного увеличивается при каждом внесении фермента (через 30 мин). Максимальная степень гидролиза через 6 ч может достигать 65-70 %.

Основной причиной уменьшения скорости гидролиза во времени, очевидно, является снижение активности ферментного препарата, что обусловлено уменьшением концентрации гепатопанкреатина в смеси при его автолизе (Мухин, Новиков, 2001), а также его дезактивацией при температуре инкубационной среды.

Нарастание содержания аминного азота хорошо коррелирует с изменением во времени молекулярно-массового состава белковых фракций в гидролизате.

4. Изменение молекулярно-массового распределения белковых фракций в гидролизате

Фотография полиакриламидного геля (рис. 2) иллюстрирует разделение белковых фракций по молекулярной массе в белоксодержащем субстрате до гидролиза (дорожка 3) и в гидролизатах, полученных при разной продолжительности реакции гидролиза (дорожки 4 и 5). Присутствуют также стандартные маркеры (дорожки 1 и 2).

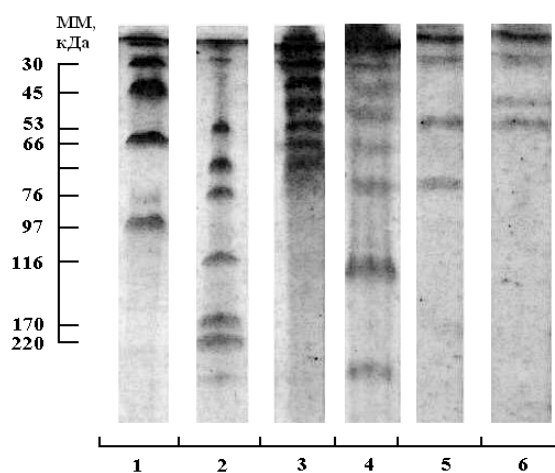


Рис. 2. Электрофореграмма разделения белковых фракций по молекулярным массам: 1 – низкомолекулярные стандартные маркеры; 2 – высокомолекулярные стандартные маркеры (*Pharmacia Biotech*); 3 – негидролизованное белоксодержащее сырье (отходы трески); 4-6 – гидролизаты, полученные в различные периоды времени: 1 мин (4); 15 мин (5); 30 мин (6)

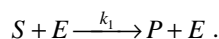
Белоксодержащее сырье (отходы переработки трески) представляет собой соединения белковой природы, молекулярная масса которых находится в пределах от 10 до 250 кДа. В течение первых 10 мин гидролиза молекулярная масса белковых фракций резко уменьшается. Как показывают данные ПААГ-электрофореза, по истечении 30 мин в гидролизате присутствуют только низкомолекулярные белковые фракции молекулярной массой менее 30 кДа.

5. Построение кинетической модели ферментативного гидролиза

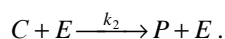
Для описания ферментативной кинетики обычно используют теорию Михаэлиса – Ментен (*Moore et al.*, 1958). Теория разработана с допущением, что фермент не расходуется (не инактивируется в процессе реакции), а весь связывается с субстратом в фермент-субстратный комплекс при высокой концентрации субстрата, значительно превышающей концентрацию фермента.

Однако экспериментально было показано (*Мухин, Новиков*, 2001), что в процессе реакции ферментативного гидролиза рыбного сырья фермент (гепатопанкреатин) расходуется, подвергаясь автолизу. Любая ферментативная реакция протекает в течение ряда промежуточных стадий. На основании полученных экспериментальных данных по кинетике гидролиза в работе предлагается упрощенный механизм ферментативного гидролиза, включающий три реакции:

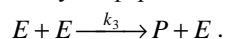
1. Взаимодействие молекулы фермента E с молекулой легко расщепляемого субстрата S с образованием продукта гидролиза P и восстановлением молекулы фермента E :



2. Взаимодействие молекулы фермента E с молекулой трудно расщепляемого субстрата C с образованием продукта гидролиза P и восстановлением молекулы фермента E :



3. Взаимодействие молекулы фермента E с другой молекулой фермента E с образованием продукта гидролиза P и восстановлением молекулы фермента E :



Во всех реакциях продукт гидролиза считается одинаковым, так как он представляет собой гидролизованный белок и регистрируется по накоплению аминного азота в гидролизате.

Реакция 2 введена исходя из экспериментально полученных кинетических кривых гидролиза (рис. 1, кривая 1; табл. 4). На кривых обнаруживается начальный участок с высокой скоростью образования продуктов гидролиза, затем – участок более медленного нарастания аминного азота. При добавлении новых порций фермента (рис. 1, кривая 2; табл. 4) видно, что скорость гидролиза снижается по сравнению с начальной V_0 . Поэтому сделано предположение, что субстрат состоит, по крайней мере, из двух групп белков, имеющих различную устойчивость к действию фермента: легко расщепляемых и трудно расщепляемых (например, коллагена).

Реакция 3 учитывает дезактивацию фермента вследствие автолиза.

Реакции образования промежуточных соединений не учитываются с целью упрощения предлагаемого механизма. Это дает возможность получения аналитического решения системы дифференциальных уравнений, описывающих введение ферментного препарата в реакционную смесь многократно через равные интервалы времени, а также расход ферментного препарата вследствие его автолиза.

Система дифференциальных уравнений имеет следующий вид:

$$\begin{cases} \frac{d}{dt} s(t) = -k_1 e(t) s(t), \\ \frac{d}{dt} c(t) = -k_2 e(t) c(t), \\ \frac{d}{dt} e(t) = -k_3 e(t)^2, \\ \frac{d}{dt} p(t) = k_1 e(t) s(t) + k_2 e(t) c(t) + k_3 e(t)^2. \end{cases}$$

Приняв, что в начальный момент времени ($t = 0$) $E = E_0$, $S = S_0$, $C = C_0$, $P = 0$, получили решение для каждого компонента реакции:

$$s(t) = S_0 \left(\frac{1}{E_0} \right)^{\frac{k_1}{k_3}} e^{-\frac{k_1 \ln \left(k_3 t + \frac{1}{E_0} \right)}{k_3}} ; \quad c(t) = C_0 \left(\frac{1}{E_0} \right)^{\frac{k_2}{k_3}} e^{-\frac{k_2 \ln \left(k_3 t + \frac{1}{E_0} \right)}{k_3}} ; \quad e(t) = \frac{1}{k_3 t + \frac{1}{E_0}} ;$$

$$p(t) = -S_0 \left(\frac{1}{E_0} \right)^{\frac{k_1}{k_3}} e^{-\frac{k_1 \ln \left(k_3 t + \frac{1}{E_0} \right)}{k_3}} - C_0 \left(\frac{1}{E_0} \right)^{\frac{k_2}{k_3}} e^{-\frac{k_2 \ln \left(k_3 t + \frac{1}{E_0} \right)}{k_3}} - \frac{1}{k_3 t + \frac{1}{E_0}} + C_0 + S_0 + E_0 + P_0 .$$

Полученные аналитические выражения применяли для расчета констант (k_1 , k_2 , k_3 и S_0) реакции ферментативного гидролиза с помощью программы *Excel*. При расчетах использовали условные значения концентраций субстрата и фермента в относительных единицах:

- концентрация субстрата $[S] + [C] = 1$;
- начальная концентрация фермента $[E] = 0.06$ (из соотношения фермента и субстрата).

Количество легко расщепляемого субстрата рассчитывали посредством оптимизации, а количество трудно расщепляемого определяли как разность $[C] = 1 - [S]$.

Обработка экспериментальных данных (рис. 1) в рамках предложенного механизма, учитывающего расход фермента, показала, что изучаемая реакция ферментативного гидролиза является реакцией 2-го порядка. Рассчитанные в соответствии с предложенным механизмом константы скорости промежуточных стадий реакции ферментативного гидролиза приведены в табл. 5.

Таблица 5. Значения констант скорости промежуточных стадий реакции ферментативного гидролиза белоксодержащего сырья (тканей трески), рассчитанные по математической модели

Константа	Значение, c^{-1}
k_1	0.0529
k_2	0.0015
k_3	0.0279

На рис. 3 приведены зависимости изменения во времени концентраций компонентов реакции ферментативного гидролиза, рассчитанные по предлагаемой модели (линии) и экспериментальные данные (точки) при однократном (рис. 3а) и многократном (рис. 3б) внесении фермента.

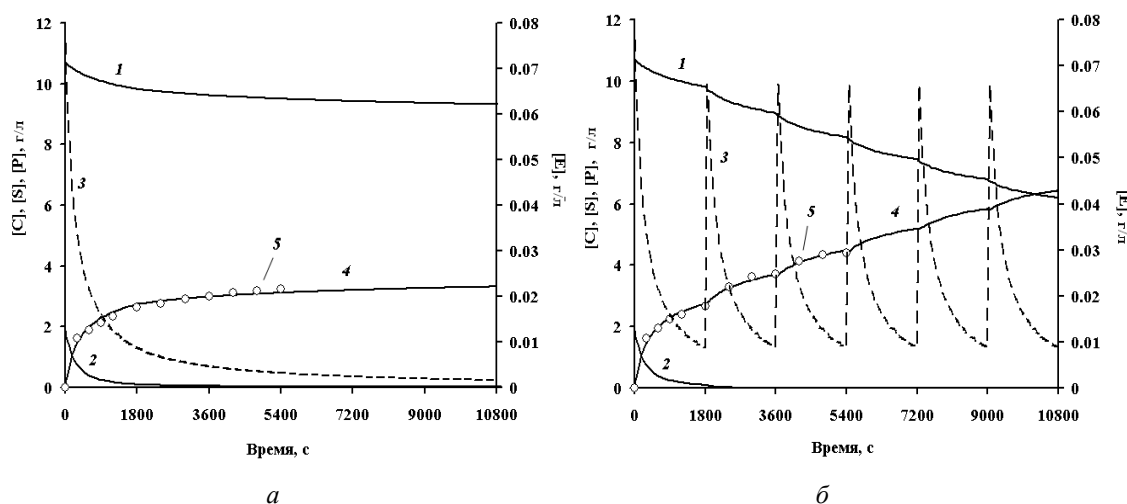


Рис. 3. Изменение во времени концентраций компонентов реакционной смеси:
 1 – трудно расщепляемый субстрат C ; 2 – легко расщепляемый субстрат S ;
 3 – ферментный препарат E ; 4 – нарастание содержания продуктов реакции P ;
 5 (незакрашенные маркеры) – нарастание содержания продуктов реакции P
 (экспериментальные данные)

6. Свойства гидролизатов, полученных разными способами

При исследовании свойств ферментативных белковых гидролизатов из тканей трески, полученных посредством однократного и многократного введения ферментного препарата, было выявлено, что массовая доля целевого продукта в гидролизатах (свободных аминокислот и низших пептидов) составляет 80.5 и 84.1 % соответственно и превосходит данный показатель аналогичных коммерческих продуктов (*Mukhin, Novikov, 2001*).

Было определено общее содержание свободных аминокислот C_{am} , характеризующее глубину гидролитического расщепления белков. Для гидролизата, полученного при многократном внесении фермента, C_{am} составляет 57.1 %, что в два раза превышает подобный показатель для гидролизата, полученного при однократном внесении фермента.

Содержание свободных аминокислот в гидролизатах, полученных двумя способами, показано на рис. 4. Содержание всех аминокислот в 1.5-2 раза выше в гидролизате, полученном при многократном

введении фермента. Необходимо отметить высокое содержание глицина, пролина и оксипролина, источником которых главным образом является коллаген. Это объясняется наличием коллагенолитической активности используемого ферментного препарата – гепатопанкреатина (Mukhin, Novikov, 2001).

Ферментативные белковые гидролизаты широко используются в виде водных растворов (дисперсий). На рис. 5 приведены гистограммы распределения частиц по размерам в водных нанодисперсиях гидролизатов ($C = 10$ мас.%) белоксодержащих тканей трески по данным фотонной корреляционной спектроскопии.

Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что в дисперсии гидролизата, полученном при порционном внесении ферментного препарата, размер частиц лежит в диапазоне от 30 до 50 нм. Это намного меньше по сравнению с частицами дисперсий гидролизата, полученного при однократном введении фермента, размер которых составляет от 190 до 450 нм. Высокая дисперсность гидролизатов является дополнительным фактором, обеспечивающим проявление биологической активности аминокислот и их хорошее усвоение живыми организмами в составе пищевых продуктов.

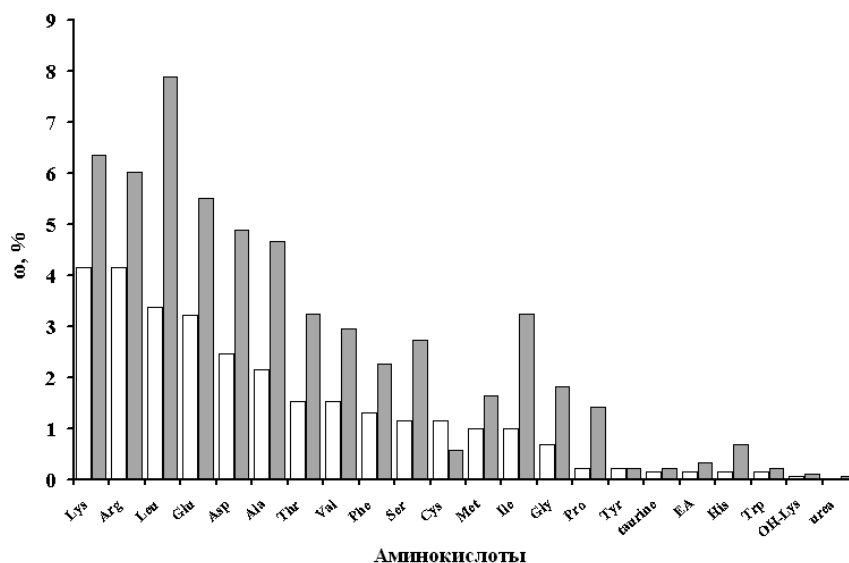


Рис. 4. Содержание свободных аминокислот в ферментативных гидролизатах, полученных при однократном (светлые колонки) и многократном (темные колонки) введении ферментативного препарата

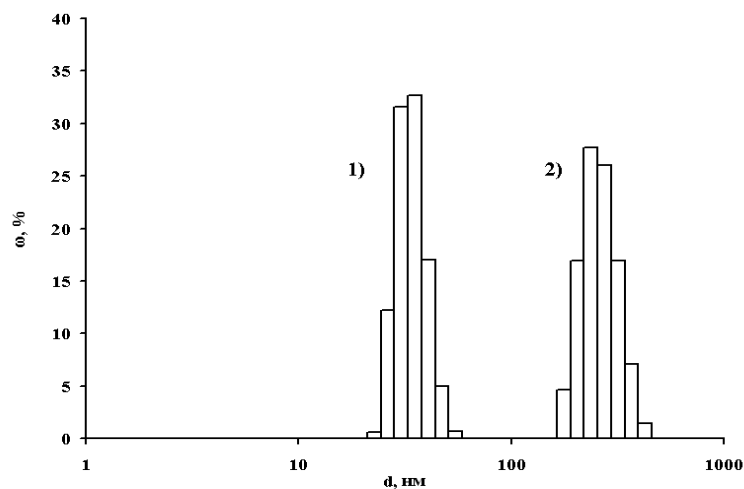


Рис. 5. Гистограммы распределения частиц по размерам в водных нанодисперсиях гидролизатов ($C = 10$ мас.%), полученных при однократном (светлые колонки) и многократном (темные колонки) введении гепатопанкреатина

7. Заключение

В работе рассмотрены кинетические закономерности ферментативного гидролиза тканей атлантической трески, который проводился с использованием гепатопанкреатина – ферментного препарата, полученного из гепатопанкреаса камчатского краба. Показано, что при традиционном однократном введении фермента в реакционную смесь скорость реакции протеолиза со временем уменьшается и через 6 ч практически стремится к нулю. Это объясняется главным образом снижением активности фермента вследствие его автолиза и дезактивацией при температуре инкубационной среды. Максимально достижимая степень гидролиза составляет 35-40 %.

Предложен новый способ проведения реакции протеолиза, который предусматривает многократное введение (через равные промежутки времени) фермента в реакционную систему. В этом случае обеспечивается поддержание высокой протеолитической активности фермента в течение всего процесса получения гидролизата. В рамках формальной кинетики рассчитаны константы скорости реакции гидролиза. Показано, что через 6 ч скорость реакции значительно превышает аналогичный параметр при проведении процесса посредством однократного введения фермента. Степень гидролиза увеличивается и достигает 50-55 %.

Представлена кинетическая модель, описывающая механизм ферментативного гидролиза, осуществляемого предложенным способом. Механизм предполагает наличие в составе субстрата двух групп белков – легко гидролизующихся и трудно гидролизующихся под действием используемого фермента, а также учитывает расход фермента вследствие его автолиза. В рамках кинетической модели рассчитаны константы промежуточных стадий реакции протеолиза.

Проведенные исследования показали улучшение коллоидно-химических свойств гидролизатов, полученных при многократном введении фермента по сравнению с гидролизатами, полученными при традиционном способе однократного введения фермента в реакционную смесь. Содержание свободных аминокислот увеличивается примерно в два раза, дисперсность водных растворов (нанодисперсий) увеличивается. Это, безусловно, свидетельствует о перспективности использования предложенного способа проведения реакции гидролиза, в том числе как составной части технологий пищевых гидролизатов.

Работа выполнена при поддержке фонда РФФИ (проект № 14-08-98811).

Литература

- Jens A.N.** Limited enzymic degradation of proteins: A new approach in the industrial application of hydrolases. *J. of Chemical Technology and Biotechnology*. 1982. V. 32, N 1. P. 138-156.
- Moore S., Spackman D., Stein W.** Chromatography aminoacids on sulfonated polystyrene resins. *Analyt. Chem.* 1958. V. 30. P. 1185-1190.
- Mukhin V.A., Novikov V.Yu.** Enzymes and enzymatic hydrolysates from invertebrates of the Barents Sea. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2001. V. 37, N 5. P. 538-542.
- Mukhin V.A., Novikov V.Yu.** Proteolysis in vitro as the way of modification of the protein tropic component. *J. of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2002. V. 38, N 4. P. 316-321.
- Novikov V.Yu., Mukhin V.A.** Detection of chitinolytic activity in digestive organs of hydrobionts from the Barents Sea. *J. of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2005. V. 41, N 4. P. 377-378.
- Dynamic light scattering – applications of photon correlation spectroscopy. Ed.: Pecora R. Plenum Press, N.Y., 1985. 420 p.
- Pivnenko T.N., Epstein L.M., Okladnikova S.V.** Comparative analysis of substrate specificity of pancreatic serine proteinases of different origin. *J. of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 1997. V. 33, N 6. P. 540-544.
- Vorob'ev M.M., Goncharova L.A.** Computer simulation of proteolysis. Peptic hydrolysis of partially demasked β -Lactoglobulin. *Nahrung*. 1998. V. 42, N 2. P. 60-66.
- Westermeier R.** Electrophoresis in practice. VCH Publishers Inc., 1993. P. 277.
- Мухин В.А., Мухина И.Н., Лебская Т.К.** Оценка степени автолиза белка в гепатопанкреасе камчатского краба *Paralithodes camtschatica* методом гель-фильтрации. Химия и технология обработки гидробионтов. Изв. ТИНРО, Владивосток, 1999. Т. 125. С. 249-253.
- Мухин В.А., Новиков В.Ю.** Ферментативные белковые гидролизаты тканей морских гидробионтов: получение, свойства и практическое использование. Изд. ПИНРО, 2001. 97 с.
- Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н., Бердугина А.В.** Свойства и применение белковых гидролизатов (обзор). *Прикладная биохимия и микробиология*. 2000. Т. 35, № 5. С. 525-534.
- Рысакова К.С., Новиков В.Ю., Мухин В.А., Серафимчик Е.М.** Гликолитическая активность ферментного препарата из гепатопанкреаса камчатского краба *Paralithodes camtschaticus*. *Прикладная биохимия и микробиология*. 2008. Т. 44, № 3. С. 281-286.

References

- Jens A.N.** Limited enzymic degradation of proteins: A new approach in the industrial application of hydrolases. J. of Chemical Technology and Biotechnology. 1982. V. 32, N 1. P. 138-156.
- Moore S., Spackman D., Stein W.** Chromatography aminoacids on sulfonated polystyrene resins. Analyt. Chem. 1958. V. 30. P. 1185-1190.
- Mukhin V.A., Novikov V.Yu.** Enzymes and enzymatic hydrolysates from invertebrates of the Barents Sea. Applied Biochemistry and Microbiology. 2001. V. 37, N 5. P. 538-542.
- Mukhin V.A., Novikov V.Yu.** Proteolysis in vitro as the way of modification of the protein tropic component. J. of Evolutionary Biochemistry and Physiology. 2002. V. 38, N 4. P. 316-321.
- Novikov V.Yu., Mukhin V.A.** Detection of chitinolytic activity in digestive organs of hydrobionts from the Barents Sea. J. of Evolutionary Biochemistry and Physiology. 2005. V. 41, N 4. P. 377-378.
- Dynamic light scattering – applications of photon correlation spectroscopy. Ed.: Pecora R. Plenum Press, N.Y., 1985. 420 p.
- Pivnenko T.N., Epstein L.M., Okladnikova S.V.** Comparative analysis of substrate specificity of pancreatic serine proteinases of different origin. J. of Evolutionary Biochemistry and Physiology. 1997. V. 33, N 6. P. 540-544.
- Vorob'ev M.M., Goncharova L.A.** Computer simulation of proteolysis. Peptic hydrolysis of partially demasked β -Lactoglobulin. Nahrung. 1998. V. 42, N 2. P. 60-66.
- Westermeyer R.** Electrophoresis in practice. VCH Publishers Inc., 1993. P. 277.
- Mukhin V.A., Mukhina I.N., Lebskaya T.K.** Otsenka stepeni avtoliza belka v gepatopankrease kamchatskogo kraba *Paralithodes camtschatica* metodom gel-filtratsii [Estimation of the protein autolysis degree in hepatopancreas of King crab *Paralithodes camtschatica* by the method of gel-filtration]. Himiya i tehnologiya obrabotki gidrobiontov. Izv. TINRO, Vladivostok, 1999. T. 125. P. 249-253.
- Mukhin V.A., Novikov V.Yu.** Fermentativnye belkovye gidrolizaty tkaney morskikh gidrobiontov: poluchenie, svoystva i prakticheskoe ispolzovanie [Enzyme protein hydrolysates of marine hydrobiont tissue: Preparation, properties and practical use]. Izd. PINRO, 2001. 97 p.
- Neklyudov A.D., Ivankin A.N., Berdutina A.V.** Svoystva i primeneniye belkovykh gidrolizatov (obzor) [Properties and practical use of protein hydrolysates (review)]. Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya. 2000. T. 35, N 5. P. 525-534.
- Rysakova K.S., Novikov V.Yu., Mukhin V.A., Serafimchik E.M.** Glikoliticheskaya aktivnost fermentnogo preparata iz gepatopankreasa kamchatskogo kraba *Paralithodes camtschaticus* [Glycolytic activity of enzyme from hepatopancreas of King crab *Paralithodes camtschaticus*]. Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya. 2008. T. 44, N 3. P. 281-286.

Информация об авторах

Новиков Виталий Юрьевич – Полярный научно-исследовательский институт морского рыбного хозяйства и океанографии им. Н.М. Книповича (ПИНРО), канд. хим. наук, ст. науч. сотрудник лаборатории биохимии и технологии, e-mail: novitaly@mail.ru

Novikov V.Yu. – Knipovich Polar Research Institute of Marine Fisheries and Oceanography (PINRO), Cand. of Chem. Sci., Senior Research Scientist of Biochemistry and Technology Department, e-mail: nowitaly@yandex.ru

Деркач Светлана Ростиславовна – Естественно-технологический институт МГТУ, зав. кафедрой химии, профессор, д-р хим. наук, e-mail: derkachsr@mstu.edu.ru

Derkach S.R. – Institute of Natural Science and Technology MSTU, Head of Chemistry Department, Professor, Dr of Chem. Sci., e-mail: derkachsr@mstu.edu.ru

Широнина Анастасия Юрьевна – факультет арктических технологий МГТУ, кафедра экологии и защиты окружающей среды, ст. преподаватель, e-mail: nesy131@rambler.ru

Shironina A.Yu. – Faculty of Arctic Technologies MSTU, Department of Ecology and Environmental Protection, Senior Lecturer, e-mail: nesy131@rambler.ru

Мухин Вячеслав Анатольевич – Полярный научно-исследовательский институт морского рыбного хозяйства и океанографии им. Н.М. Книповича (ПИНРО), д-р биол. наук, зав. лабораторией биохимии и технологии, e-mail: vmukhin@pinro.ru

Mukhin V.A. – Knipovich Polar Research Institute of Marine Fisheries and Oceanography (PINRO), Head of Biochemistry and Technology Department, Dr of Biol. Sci., e-mail: vmukhin@pinro.ru