

УДК 577.151.63

## Исследование ферментного препарата из пищеварительных органов пресноводной форели ручьевой

Е. А. БАЖЕНОВ<sup>1</sup>, канд. техн. наук Л. С. БАЙДАЛИНОВА<sup>1</sup>, Т. ГРИММ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Калининградский государственный технический университет

<sup>2</sup>Биотехнологическая компания ANIMOXS, Германия

E-mail: ya.elisey2013@yandex.ru

*Представлены результаты исследования протеолитической активности ферментов, выделенных из пищеварительных органов (кишечников с желудками) обыкновенной форели ручьевой пресноводной аквакультуры, оценки эффективности гидролиза этими ферментами мясного сырья и рыбного коллагенсодержащего. Определена молекулярная масса ферментов препарата из пищеварительных органов форели. Результаты эффективности гидролиза выделенными ферментами белкового субстрата оценены по молекулярной массе фрагментов, полученных при гидролизе. Молекулярные массы определены методом эксклюзионной гель-хроматографии при использовании в качестве неподвижной фазы в хроматографической колонке Sephadex G-75 Superfine. Эксперименты проведены в исследовательской лаборатории ANIMOXS в Берлине при поддержке Немецкого экологического фонда. Ферментные препараты выделялись из пищеварительного тракта (кишечника с желудком) форели при первоначальном автопротеолизе для частичного разрушения ферментсодержащих клеток в буферном растворе с pH 8,0 в течение 3,5 ч при 37 °C. Экстракт (раствор ферментов), освобожденный от жировой фракции и плотного остатка, использовали для последующих исследований. Изучение состава ферментного препарата методом гель-проникающей хроматографии показало наличие в нем основной по массе фракции с молекулярной массой 26 кДа и более высокомолекулярной фракции с молекулярной массой 36–38 кДа. Исследование эффективности воздействия ферментов на мясной и коллагенсодержащий рыбный субстрат (плавательные пузыри форели и леца) показало высокую гидролитическую способность. Исследование подтвердило возможность использования вторичного сырья пресноводного аквакультурного объекта форели ручьевой для получения гидролитических ферментов. В препаратах установлено наличие протеолитических ферментов пепсина, трипсина, химотрипсина, коллагеназы, а также обнаружена липаза.*

**Ключевые слова:** протеолитические ферменты, форель ручьевая, вторичное сырье, пищеварительные органы рыб, мясные субстраты, рыбные коллагенсодержащие субстраты, гель-проникающая хроматография, молекулярная масса.

### Информация о статье:

Поступила в редакцию 31.01.2022, одобрена после рецензирования 13.05.2022, принята к печати 16.06.2022

DOI: 10.17586/1606-4313-2022-21-3-27-38

Язык статьи — русский

### Для цитирования:

Баженов Е. А., Байдалинова Л. С., Гримм Т. Исследование ферментного препарата из пищеварительных органов пресноводной форели ручьевой // Вестник Международной академии холода. 2022. № 3. С. 27–28. DOI: 10.17586/1606-4313-2022-21-3-27-38

## Study of an enzyme preparation from the digestive organs of freshwater brook trout

E. A. BAZHENOV<sup>1</sup>, D. Sc L. S. BAYDALINOVA<sup>2</sup>, T. GRIMM

<sup>1</sup>Kaliningrad State Technical University

<sup>2</sup>Biotechnology company ANIMOXS GmbH, Germany

E-mail: ya.elisey2013@yandex.ru

*The results of the study of the proteolytic activity of enzymes isolated from the digestive organs (intestines with stomachs) are presented common trout of freshwater freshwater aquaculture, evaluation of the effectiveness of hydrolysis of meat raw materials and fish collagen-containing by these enzymes. The molecular weight of the enzymes of the preparation from the digestive organs of trout was determined. The results of the efficiency of hydrolysis by the separated enzymes of the protein substrate were evaluated by the molecular weight of the fragments obtained during hydrolysis. Molecular weights were determined by exclusive gel chromatography when used as a stationary phase in a Sephadex G-75 Superfine chromatographic column. The experiments were carried out at the ANIMOXS research laboratory in Berlin with the support*

*of the German Environmental Foundation. Enzyme preparations were isolated from the digestive tract (intestines with stomach) of trout during initial autoprolysis for partial destruction of enzyme-containing cells into a buffer. Enzyme preparations were isolated from the digestive tract (intestines with stomach) of trout during initial autoprolysis for partial destruction of enzyme-containing cells in a buffer solution with a pH of 8.0 for 3.5 hours at 37 °C. The extract (enzyme solution), freed from the fat fraction and dense residue, was used for subsequent studies. The study of the composition of the enzyme preparation by gel-penetrating chromatography showed the presence of a bulk fraction with a molecular weight of 26 kDa and a higher molecular fraction with a molecular weight of 36–38 kDa. The study of the effectiveness of the effect of enzymes on meat and collagen-containing fish substrate (trout and bream swim bladders) showed a high hydrolytic ability. The study confirmed the possibility of using secondary raw materials of freshwater aquaculture facility trout brook to obtain hydrolytic enzymes. The presence of proteolytic enzymes pepsin, trypsin was found in the preparations, chymotrypsin, collagenase, and lipase was also detected.*

**Keywords:** proteolytic enzymes, brook trout, secondary raw materials, fish digestive organs, meat substrates, fish collagen-containing substrates, gel-penetrating chromatography, molecular weight.

#### Article info:

Received 31/01/2022, approved after reviewing 13/05/2022, accepted 16/06/2022

DOI: 10.17586/1606-4313-2022-21-3-27-38

Article in Russian

#### For citation:

Bazhenov E. A., Baydalina L. S., Grimm T. Study of an enzyme preparation from the digestive organs of freshwater brook trout. *Journal of International Academy of Refrigeration*. 2022. No 3. p. 27–38. DOI: 10.17586/1606-4313-2022-21-3-27-38

### Введение

В природном органическом сырье одновременно присутствуют многочисленные ферменты с различными характеристиками. Извлечь из органического сырья индивидуальные ферменты оказывается практически невозможно, т. к. разделение белков всегда сложный процесс из-за их близких свойств, а также высокой лабильности при внешних воздействиях.

Основной источник ферментов в настоящее время — микробиологический синтез. Некоторое количество ферментных препаратов выделяется из растительного и животного сырья. Все это комплексы ферментов с преобладанием какого-либо преобладающего компонента. В общем потреблении промышленностью на первом месте стоят амилолитические и протеолитические ферменты. Основной областью использования протеолитических ферментов является пищевая промышленность [1, 2].

Широкое распространение ферментные препараты получают в мясной промышленности [3, 4], здесь наибольшее распространение имеют растительные импортные препараты.

В молочной промышленности ферменты используются в производстве сырных продуктов, творожных продуктов повышенной биологической ценности, кисломолочных биопродуктов [5, 6], для биомодификации молочно-белковых концентратов [7, 8].

Расширяются потребности в ферментных препаратах для биотрансформации белков при переработке зернового сырья [9]–[12].

В рыбной промышленности ферментные препараты успешно используются при производстве соленой и холодного копчения рыбы, пресервов. Складываются потребности в ферментах в развивающемся новом направлении производства из вторичного рыбного сырья биологически активных веществ, пептидов, препаратов хондропротекторного действия и других БАВ [13]–[16]. Ферментные препараты используются для биodeградации

рыбного сырья с получением продуктов заданного состава и свойств. В отдельных технологиях требуется, наоборот, торможение гидролитических процессов с использованием ингибиторов ферментативного катализа [15].

В настоящее время разрабатываются комплексные технологии переработки с использованием ферментов органических отходов от разделки гидробионтов для производства гидролизатов [16] и коллагенсодержащих гидролизатов пищевого назначения [17], для производства структурообразователей из кожи и костных тканей рыб [18].

Эффективным оказывается использование ферментов при переработке вторичного сырья на кормовые продукты [14], при выделении жира [19], полиненасыщенных жирных кислот, биологически активных липидных комплексов [20]. Ферментные препараты испытываются для биodeградации и получения низкомолекулярного коллагена из нетрадиционных объектов — медузы репидемы [21], для переработки отходов дальневосточных крабов [22], морских звезд [23] и других водных объектов, обладающих мощными биологически активными комплексами. Используются и совершенствуются современные медицинские средства на основе коллагеназы [24].

Для мясной и рыбоперерабатывающей отраслей целесообразны протеазы, способные придавать целевым продуктам аромат и вкус созревших. Этим объясняется потребность в ферментах из природного животного сырья, в том числе вторичного рыбного.

В рыбной промышленности к вторичному сырью относятся пищеварительные органы рыб и других объектов водного происхождения, обладающие протеолитической, амилолитической и липолитической активностью.

Разработка, совершенствование методов переработки, хранения и транспортировки, внедрение ресурсосберегающих и безотходных технологий осуществляются исследователями различных регионов с использованием морского вторичного сырья, а также объектов внутренних водоемов и аквакультуры [16, 25, 26.]. Разрабатываемые технологии направлены на повышение эффектив-

ности использования природного органического ферментсодержащего сырья для расширения ассортимента, повышения качества и выходов готовой рыбной продукции. При технологических разработках выявляется недостаток исследований молекулярного строения ферментов и образующихся под их действием продуктов деструкции. Требуется изучение особенностей состава и свойств ферментов, субстратной специфичности. Для характеристики фракционного состава рассматриваются различные аспекты. Одной из важных характеристик можно считать молекулярную массу. Аналитиками в биохимии и биотехнологии используется несколько способов определения молекулярной массы белков: расчетные; вискозиметрические; осмометрические; оптические; гравиметрические (ультрацентрифугирование); гель-фильтрация (гель-проникающая хроматография), электрофорез, ультрафильтрация. Наиболее эффективными считаются гравиметрические (ультрацентрифугирование) и электрофорез. Значительно чаще молекулярная масса определяется гель-фильтрацией (гельпроникающей хроматографией) и электрофорезом.

Гель-фильтрация, или метод молекулярных сит [3, 12, 14, 17, 20, 25, 27], заключается в пропускании растворов белков через колонку с гелем сефадекса или других (агарозных, полистирольных) полимеров. Наиболее распространены декстрановые гели (сефадекс), являющиеся продуктом поперечного сшивания полисахаридных цепочек декстрана. Гели проницаемы для молекул благодаря внутренним каналам в них с определенным средним диаметром. Низкомолекулярные белки распределяются в растворенном виде как внутри частиц полимера, так и между частицами, а высокомолекулярные — только между частицами. Поэтому высокомолекулярные белки быстрее проходят через колонку и первыми элюируются из нее. Остальные белки задерживаются в колонке на разных уровнях в зависимости от молекулярной массы и могут быть собраны при элюировании в виде отдельных фракций. Время удержания, объем выхода (объем элюата) для того или иного белка зависит в основном от его молекулярной массы. Недостатком способа гель — хроматографии является недостаточное разделение молекул с близкими молекулярными массами.

Метод электрофоретического разделения заключается в способности молекул пептидов и аминокислот, находясь в заряженной форме в виде катионов или анионов, передвигаться в электрическом поле с определенной скоростью. Кроме того, молекулы с близкими зарядами, но разными размерами, отличаются отношением заряда к массе. Эти различия обеспечивают высокую разрешающую способность электрофоретических методов. Наиболее распространенным методом фракционирования белков является диск-электрофорез в ПААГ [8, 12, 18, 21].

В Российской Федерации резерв вторичного рыбного сырья (головы, хребтовые кости, пищеварительные органы, чешуя, кишечники рыб и т. д.) большой. Это сырье дешево и доступно, поэтому его переработка для повышения эффективности производства актуальна. В связи с этим актуальны и исследования, направленные на изучение, разработку технологий и производство ферментных препаратов из пищеварительных органов рыб. Первоначаль-

но источниками ферментов считались океанические и морские рыбы скумбрия, сельдь, лососевые, килька и др. Со снижением объемов океанического промысла в качестве объектов для выделения протеолитических ферментов представляет интерес вторичное сырье рыб прудовых, внутренних водоемов, объектов аквакультуры.

В рамках стипендии Немецкого экологического фонда в исследовательской лаборатории ANiMOX в Берлине проведен ряд экспериментальных работ по технологиям переработки вторичного рыбного сырья, в том числе по технологии использования для получения ферментов отходов от разделки форели.

### Цель и задачи исследования

Цель работы заключалась в получении ферментного препарата из пищеварительных органов форели, исследовании его состава, характеристик и определении эффективности воздействия препарата на различные субстраты (плавательные пузыри рыб и мясной субстрат — говяжий фарш).

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи.

1. Определение возможности использования вторичного сырья пресноводной форели ручьевой (объекта аквакультуры) для выделения гидролитических, в первую очередь протеолитических ферментов, исследование характеристик получаемых препаратов;
2. Гель-фильтрационное разделение и оценка молекулярно-массового распределения фракций ферментов в экспериментальном препарате из пищеварительных органов форели;
3. Определение эффективности гидролиза ферментным комплексом из пищеварительных органов форели коллагенсодержащего субстрата (плавательные пузыри форели и леща), а также белков мышечных тканей;
4. Определение оптимальной концентрации фермента для обеспечения максимальной эффективности гидролиза при получении продуктов с различными молекулярными массами.

### Материалы и методы исследования

Материалом при проведении экспериментов служили пищеварительные органы речной форели (обыкновенная ручьевая форель — *Salmo trutta* var. *Fario*), выращиваемой в пресноводных аквахозяйствах. Материал был предоставлен рыбоперерабатывающими предприятиями, расположенными близ Берлина.

Кишечники с пилорическими придатками и желудками отбирали при разделке свежих рыб, очищали от содержимого, замораживали и хранили при температуре не выше минус 20 °С. Для экспериментов сырье измельчали без размораживания. Для получения экстрактов (ферментных препаратов) измельченный материал смешивали с фосфатным буферным раствором с pH 8,0 в соотношении 1:1 и выдерживали при перемешивании при температуре 37 °С в течение 3,5 ч. Полученную смесь разделяли на фракции белковую (раствор ферментов), жировую и плотный остаток центрифугированием в течение 20 мин при 4000 об/мин.

Экстракт (ферментный препарат) использовался для исследования характеристик, а также для гидролиза

рыбных коллагенсодержащих субстратов и мясного субстрата (фарш говяжий) в количествах от 0,5 до 10% к массе смеси субстратов с буферным раствором.

Исследования проводили в установке Termo Fisher scientific. К смеси субстрата (2 г) с фосфатным буфером с pH 8,0 в соотношении 1:2 добавляли ферментный препарат в указанных количествах. Гидролиз субстратов проводили при постоянном перемешивании при температуре 35 °C в течение 3 ч и останавливали нагреванием при 80 °C в течение 15 мин. Смесь разделяли центрифугированием при 4000 об/мин в течение 20 мин. Отделенные гидролизаты фильтровали через микрофильтр Whatman (0,45 µm PVDF). Фиксировали массы получаемых фракций.

При исследовании фракционного состава белков ферментного препарата его дополнительно после фильтрации через микрофильтр Whatman (0,45 µm PVDF) центрифугировали при 4000 об/мин в течение 15 мин. Освобожденный дополнительно от жира и взвесей центрифугат использовали для определения молекулярной массы составляющих его ферментов, а также для оценки ферментативной активности протеолитических и липолитических составляющих.

Фракционный состав белков ферментного препарата определяли методом эксклюзионной гели — проникающей хроматографии, которая многими исследователями используется при оценке биомодификации рыбного сырья [12, 14, 17, 22, 26–29]. Разделение фракций проводилось на установке Merck-Hitachi LaChrom (L-7000 Serie) с программным обеспечением, позволяющим рассчитывать молекулярные массы полимеров на основании значений абсорбции в элюированных фракциях и времени их удерживания. [30].

Для гели-хроматографии колонку диаметром 1 см и длиной 70 см заполняли набухшим сефадексом на высоту 65 см. Неподвижной фазой являлся Sephadex G-75 Superfine [31, 32], который применяется для разделения низкомолекулярных белковых соединений, включая ферменты. После уравнивания в колонку вносили исследуемый образец.

Элюировали фракции фосфатным буфером с pH 8. Элюаты собирали порциями по 2 см<sup>3</sup>, в которых определяли абсорбцию при 280 нм.

Молекулярные массы рассчитывали с использованием стандарта маркерных полимеров Bio-Rad Gel Filtration Standard (cat #151 1901) с компонентами с известными молекулярными массами: бычий сывороточный альбумин (69 кДа), овальбумин (44 кДа), миоглобин (лошадь, 17 кДа), витамин B<sub>12</sub> (1,350 кДа). Расчет выполнялся системой Excel для всех фракций каждого образца.

Результаты разделения стандартных белков с определенными молекулярными массами представлены на рис. 1.

Протеолитическую активность ферментов определяли модифицированным методом Ансона (ГОСТ20264.2–88) [33]. Модификация заключалась в том, что гидролиз субстрата казеината натрия ферментным препаратом проводили при 35°C в течение 30 мин. Ферментативную активность оценивали по величине абсорбции в продуктах гидролиза, которые не осаждались трихлоруксусной кислотой, и выражали значением dE /мин. Активность выражали в единицах скорректированной абсорбции (dE/мин), представляющих разницу в значениях абсорбции испытуемого и контрольного образцов с учетом разведения.

Активность липазы в ферментном препарате выражалась так называемым «липазным числом» (см<sup>3</sup>/г. мин), т. е. количеством см<sup>3</sup> 0,1 М раствора NaOH, пошедшим на нейтрализацию свободных жирных кислот, образовавшихся в результате гидролиза жира (10 г оливкового масла) под действием 0,5 см<sup>3</sup> ферментного раствора. Гидролиз проводился при температуре 37 °C в течение 5 мин. Для измерения использовался прибор автоматического титрования (T50 MT-Titrator).

При оценке эффективности гидролиза ферментным препаратом белкового субстрата — измельченных плавающих пузырей форели и леща, говяжьего фарша использовали образец без дополнительной очистки. Ферментный раствор в заданных концентрациях вносился

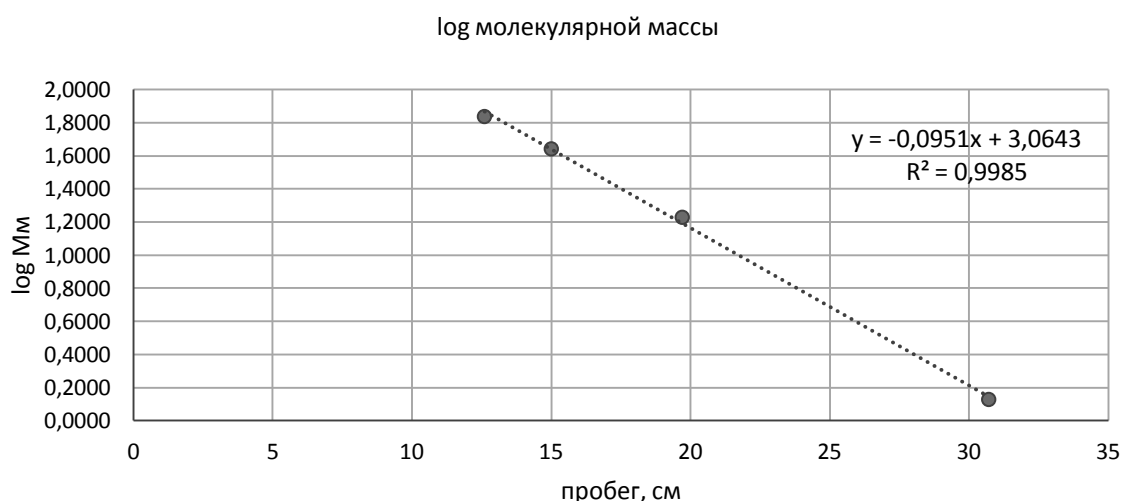


Рис. 1. Распределение стандартных маркерных белков с определенными молекулярными массами (69 кДа — альбумин; 44 кДа — овальбумин; 17 кДа — миоглобин; 1,35 кДа — витамин B<sub>12</sub>)

Fig. 1. Distribution of standard marker proteins with certain molecular weights (69 kDa — albumin; 44 kDa — ovalbumin; 17 kDa — myoglobin; 1.35 kDa — vitamin B<sub>12</sub>)

в смесь измельченного субстрата с буферным раствором (рН 8,0) при соотношении 1:2. Смесь выдерживалась для гидролиза субстрата в течение 3 ч при 35 °С, после чего в течение 15 мин при 80 °С для прекращения гидролиза. Разделение проводилось центрифугированием. 0,5 см<sup>3</sup> полученного ферментолита вносили в колонку с сефадексом для разделения фракций по молекулярной массе. В собранных фракциях элюата определяли величину абсорбции при 280 нм и рассчитывали молекулярную массу.

Для сравнения эффективности исследуемого препарата проводился гидролиз этих же субстратов (плавательных пузырей форели и леща) ферментом Алкалаза L 2,5 (продуцент *Bacillus subtilis*), добавлявшимся в количестве 1% от массы субстрата и буферного раствора. Контролем служили образцы, в которых субстрат выдерживался при тех же условиях без ферментного препарата.

Обработку полученных экспериментальных данных в ходе исследований проводили с применением методов математической статистики с использованием программ Microsoft Excel. Исследования проводили в одинаковых условиях в 3–5-й повторности, вычисляя среднее арифметическое результатов, дисперсию и среднее квадратичное отклонение. Результаты измерений записывали следующим образом:  $\bar{X} \pm S$ .

### Результаты исследования, их обсуждение

Эксперименты показали, что пищеварительные органы (кишечник с желудком) у пресноводной форели составляют 7,5–8,0% от ее массы. Определено, что из кишечника с желудками форели ручьевой ферментные препараты выделяются при температурно-временных режимах, аналогичных установленным ранее для выделения ферментов из пищеварительных органов леща и судака [25, 26]. Характеристика полученного препарата представлена в табл. 1.

Препарат имеет показатели, подобные ферментным препаратам, получаемым из пищеварительных органов судака и леща.

*Определение эффективности воздействия ферментного препарата на белки животной мышечной ткани — говяжий фарш.*

Фракционный состав ферментного препарата оценивали по эффективности его воздействия на субстрат при разных рН (в зонах кислой, нейтральной и щелочной). Исследование проводили в установке Thermo Fisher scientific, позволяющей обеспечить стабильность термического режима и постоянное перемешивание проб в течение всего процесса гидролиза. Говяжий фарш (2 г) смешивали с буферными растворами с рН 9,5, 7,0 и 2,5 в соотношениях 1:2. Ферментный препарат из кишечника форели добавляли в количестве 1% к массе смеси. Процесс проводили при 37 °С в течение 3,5 ч. Параллельно проводился опыт с использованием 1% ферментного препарата Алкалаза L 2,5.

Результаты воздействия ферментных препаратов на фарш говядины при разных рН оценивались по количеству образующихся центрифугатов, содержаниям в них сухих веществ и количеству плотных негидролизированных остатков. Результаты представлены в табл. 2.

Установлено, что ферментный препарат из пищеварительных органов форели успешно гидролизует белки животной мышечной ткани, содержащей миоген, миоглобин, актин, миозин, актомиозин и др. Наиболее высокая степень гидролиза говядины выявлена при рН 7,0 (получено 61,15±0,74% гидролизата). Близки к этому рН

Таблица 1

#### Характеристика ферментного препарата из кишечника с желудками форели ручьевой

Table 1

#### Characteristics of the enzyme preparation from the intestines with the stomachs of trout brook

Показатели	Характеристика и нормы
Внешний вид	Прозрачный раствор
Цвет	Темно-коричневый
Запах	Слабый специфический, характерный для данного вида продукции
Массовая доля сухих веществ, %	6,35
Массовая доля белка, %	4,8
Протеолитическая активность по Ансону, ед/г	2,9

Таблица 2

#### Результаты гидролиза мышечной ткани говядины под действием ферментного препарата из пищеварительных органов форели при различных рН

Table 2

#### Results of hydrolysis of beef muscle tissue under the action of an enzyme preparation from the digestive organs of trout at different pH

рН буферного раствора	Масса говяжьего фарша, г	Масса буферного раствора, г	Масса фарша, буферного раствора и фермента	Центрифугат		Сухие вещества в центрифугате		Плотный непрогидролизированный остаток	
				масса, г	% от массы фарша, буферного раствора и фермента	г	%	масса, г	% от массы фарша, буферного раствора и фермента
9,5	2,0373	4,00	6,0976	3,240±0,0023	53,13±0,56	0,0950	2,9	2,8576±0,0023	46,86±0,64
7,0	2,0878	4,00	6,1486	3,7597±0,0064	61,15±0,74	0,1196	3,2	2,3889±0,0023	38,85±0,81
2,5	2,0129	4,00	6,0730	3,5956±0,0040	59,20±0,19	0,1273	3,5	2,4774±0,0023	40,79±0,47
Алкалаза L 2,5, 1%, рН 8,0	2,0045	4,00	6,0645	3,3528±0,0035	55,28±0,43	0,2028	6,04	2,7117 0,0023±	44,71±0,31

максимальные активности основных ферментов трипсина, химотрипсина, коллагеназы. Следовательно, можно считать, что эти ферменты содержатся в препарате, полученном из пищеварительных органов форели. Коллагена в говяжьем фарше мало, поэтому коллагеназа не могла оказать значительного влияния на результат.

Но ферментный препарат является комплексным и, как показал эксперимент, проявляет достаточно высокую активность при pH 2,5 ( $59,20 \pm 0,19\%$  гидролизата). Это свидетельствует, что в препарате наряду с другими протеазами содержится и пепсин, так как для получения препарата использовались кишечника форели вместе с желудками. Форель рыба хищная и желудки обособлены и достаточно большие. В составе препарата пепсин не активен, но проявляет активность в благоприятных условиях (при pH 2,5).

Таким образом, в ферментном препарате из кишечника форели содержатся щелочные, нейтральные и кислые протеиназы. Наибольшая активность зафиксирована при pH 7,0. По количеству образующегося гидролизата (фильтрата) препарат при значениях pH 7,0 и 2,5 не уступает бактериальному препарату алкалаза (pH 8,0), в составе которого трипсин, химотрипсин, коллагеназа и амилаза.

Под воздействием алкалазы в жидкую фракцию извлекается больше сухих веществ, что свидетельствует о большей глубине расщепления ею белков при этих условиях.

При гель-проникающей хроматографии эффект разделения основан не на фильтрации, а на различных объемах диффузии, доступных для молекул разного размера. Более крупные молекулы размещаются в промежутках между шариками неподвижной фазы, быстрее проходят через хроматографическую колонку и обнаруживаются в более ранних фракциях элюата. Поры полимеров неподвижной фазы позволяют проникать в них мелким молекулам, что значительно увеличивает доступный для этих молекул объем диффузии и, следовательно, время удерживания. Поэтому маленькие молекулы удерживаются дольше, чем большие. Это делает метод выделения больших молекул относительно быстрым [30]. Оставши-

еся очень большие и очень маленькие молекулы, как правило, не могут быть разделены.

Перед хроматографическим разделением ферментный препарат дополнительно очищали: после пропускания через микрофильтр он подвергался центрифугированию при 4000 об/мин. Это позволило очистить раствор от механических включений и частично от остатков жира, которые мешают прохождению экстракта через колонку и могут влиять на результаты.

Хроматограмма молекулярно-массового распределения белков и пептидов ферментного препарата из кишечника форели речной (ручьевой) представлена на рис. 2. Разделение проводилось при следующих условиях: колонка 1,0×70 см, высота слоя селикагеля Sephadex G-75 Superfine 65 см. Элюирующий буфер 0,1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> с pH 8,0. Скорость потока: 0,2 см<sup>3</sup>/мин. Объем каждой собираемой дозы элюата 2 см<sup>3</sup>. Продолжительность элюирования 6,8 ч. Фиксировались абсорбция белка, активность протеаз и активность липазы.

При элюировании на кривой протеаз выделяются пять пиков, наиболее отчетливо — три пика, на кривой липазы — 3 пика. Характеристика пиков представлена в табл. 3.

Пики активных протеаз в ферментном препарате фиксируются в элюатах, собираемых от 22 до 74 см<sup>3</sup>. Первый пик, выходящий в элюате от 20 до 25 см<sup>3</sup>, включает протеазы со сравнительно большой молекулярной массой 30 кДа (протеолитическая активность 0,006 дЕ/мин).

Второй пик приходится на элюаты, собираемые от 25 до 30 см<sup>3</sup> (протеаза не распознана). Третий пик, выходящий в элюатах в промежутке от 40 до 60 см<sup>3</sup>, приходится на протеазы с молекулярной массой 25 кДа (0,038 дЕ/мин). Можно считать, что протеаза первого пика представляет собой коллагеназу (коллагеназа из гепатопанкреаса краба представляет собой смесь ферментов с молекулярными массами 23–38 кДа). Оптимальный уровень pH для коллагеназы 6,5–8,5. Именно в этом диапазоне находится pH буферного раствора, которым экстрагировали ферменты из исходного сырья и элюировали фракции. Эту протеазу нельзя отнести к пепсину, который при данном уровне pH не активен.

Таблица 3

**Характеристики фракций, образующихся при хроматографировании ферментного препарата из кишечника с желудками форели ручьевой**

Table 3

**Characteristics of fractions formed during chromatography of an enzyme preparation from the intestines with the stomachs of brook trout**

Номер пика	Объем элюата, при котором выходит пик, см <sup>3</sup>	Доля фракции, % от общего количества белка	Молекулярная масса, кДа	Активность протеазы, дЕ/мин	Активность липазы, см <sup>3</sup> 0,1 M NaOH/г·мин
Кривая протеаз					
1	22	2,51	30	0,007	—
2	28	1,13	28	0,002	—
3	42	35,07	23,6	0,011	—
4	48	59,83	22,5	0,038	—
5	74	1,44	19,0	0,001	—
Кривая липаз					
1	28	65,51	28,0	—	0,008
2	38	22,75	26,0	—	0,021
3	44	11,74	25,0	—	0,007

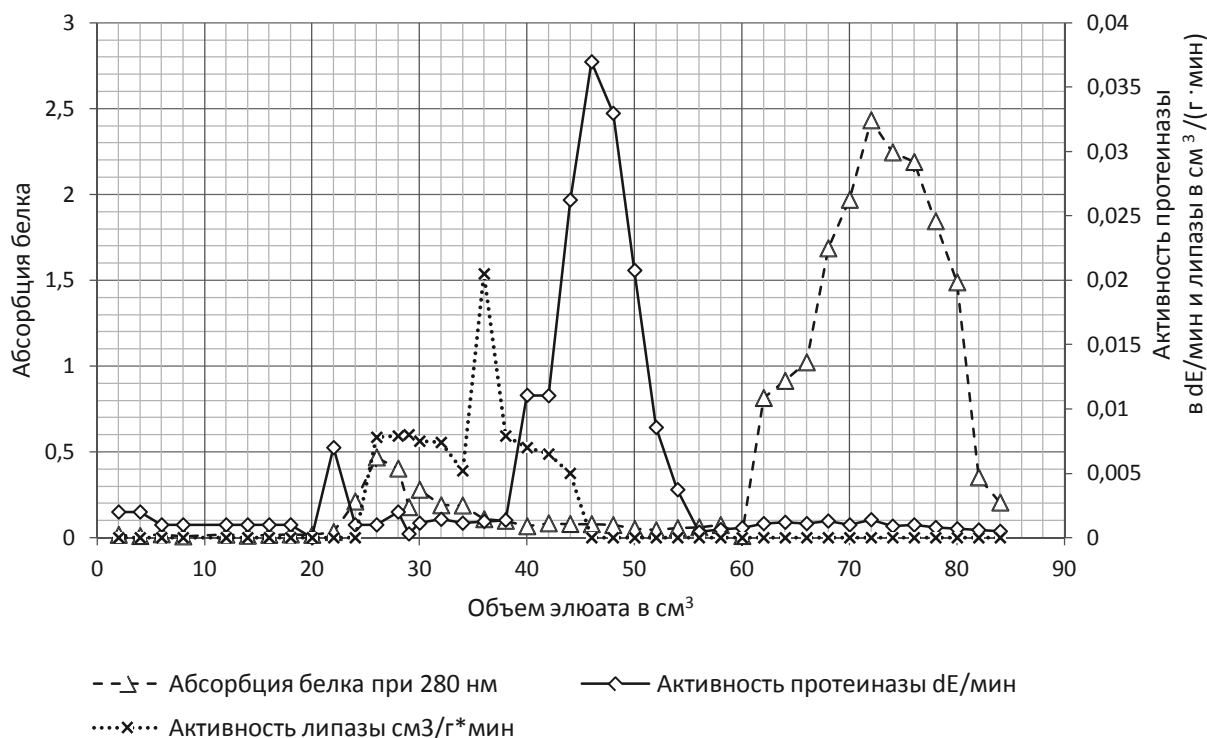


Рис. 2. Хроматограмма молекулярно-массового распределения белков и пептидов ферментного препарата из кишечника форели речной (ручьевой)

Fig. 2. Chromatogram for molecular-mass distribution of proteins and peptides of an enzyme preparation from the intestines of river (brook) trout

В третьем пике просматриваются две составляющие, четкого разделения которых не удалось осуществить. Неспособность разделять полимеры с близкой молекулярной массой и является недостатком гель-хроматографии. Молекулярная масса этих фракций определилась на уровне 23,6–22,5 кДа. Это означает, что в этой фракции содержатся две протеазы, которые по молекулярной массе схожи с трипсином (молекулярная масса 23 кДа) и химотрипсином (молекулярная масса 21,6 кДа), гидролизующие белки в щелочном диапазоне. Эти ферменты образуются у рыб в передней части кишечника с пилорическими придатками и поджелудочной железой, а именно такое сырье использовано в эксперименте.

Фракция, выходящая в элюатах от 62 до 86 см³, представляет собой низкомолекулярные пептиды или свободные аминокислоты, протеолитическая активность в которых крайне низкая или полностью отсутствует (рис. 2).

На кривой, получающейся по результатам определения липолитической активности в собираемых фракциях, также видны три пика, но левый пик фактически не разделился. Поэтому считаем доказанным присутствие молекул липазы А с молекулярной массой 28,0–26,0 кДа (липазная активность 0,021 см³/г·мин). Липолитические ферменты с молекулярной массой 27 кДа продуцируются у рыб в желудках, кишечниках с пилорическими придатками, поджелудочной железой, а также микроорганизмами *Bacillus subtilis*. Эти микроорганизмы присутствуют в кишечниках рыб.

Обнаружение в ферментном препарате коллагеназы послужило основанием для изучения эффективности воздействия его на коллагенсодержащий субстрат. В качестве субстратов использовали плавательные пузыри форели и леща. Концентрации фермента изменяли от 1

до 5% для гидролиза пузырей форели и от 0,5 до 10% для пузырей леща.

Результаты представлены на рис. 3 и 4.

Как видно из рис. 3, в ферментализатах плавательных пузырей форели обнаруживаются фракции с молекулярными массами от < 1 кДа до > 50 кДа, при этом происходит глубокий гидролиз субстрата с интенсивным накоплением фракций с молекулярными массами < 1 кДа и 5–1 кДа. Количество низкомолекулярных фрагментов в них 58 и 30%, соответственно (от общего количества сырого белка). Это свидетельствует о высокой активности ферментов исследуемого препарата. Но она несколько уступает активности фермента микробиологического синтеза Алкалаза L2,5. Количества белков с равными молекулярными массами оказываются практически одинаковыми в образцах с разными количествами добавленных ферментов (от 2 до 5%). Следовательно, увеличивать концентрацию фермента выше 2% нецелесообразно. Следует отметить, что плавательные пузыри форели очень нежные, с тонкими стенками (0,2 мм). Они легко гидролизуются предположительно содержащейся в комплексе коллагеназой.

Интенсивное накопление низкомолекулярных фракций (<1 кДа и 1–5 кДа) можно считать свидетельством того, что в препарате наряду с эндопептидазами присутствуют преобладающие экзопептидазы, эффективно гидролизующие образующиеся в процессе гидролиза фрагменты.

Необходимо отметить, что исследуемый препарат несколько уступает ферментному препарату микробиологического происхождения Алкалаза L2,5, при воздействии которого накопление низкомолекулярных фрагментов (<1 кДа и 1–5 кДа) более интенсивно.

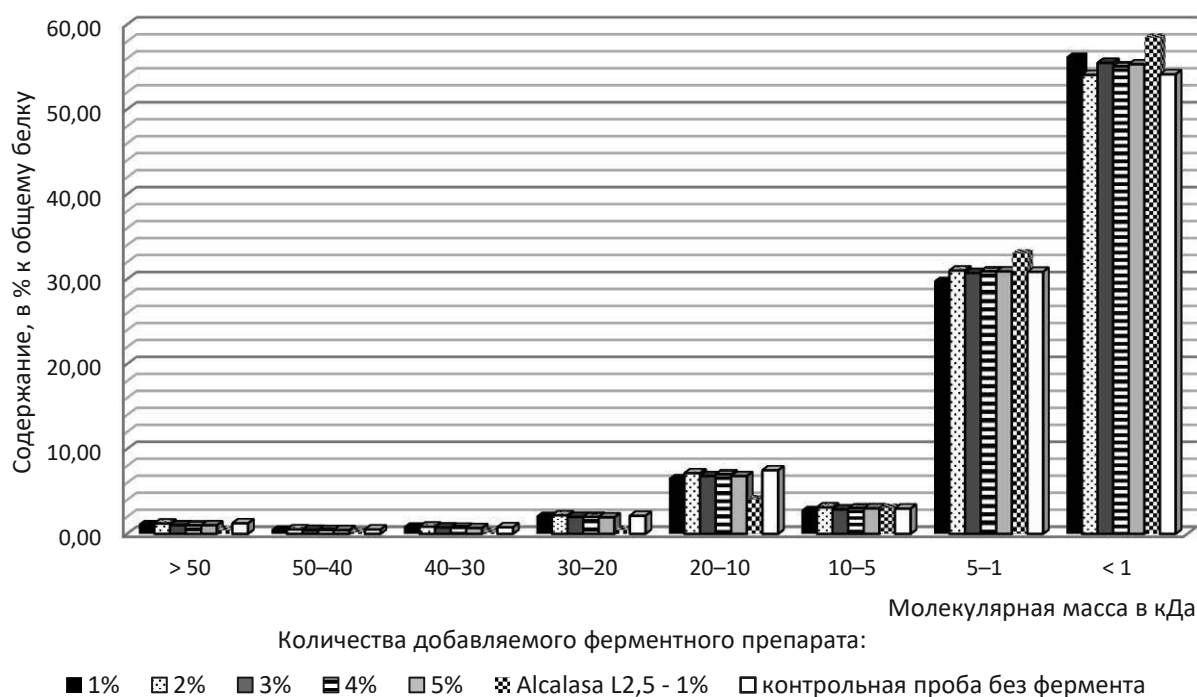


Рис. 3. Хроматограмма молекулярно-массового распределения продуктов гидролиза плавательных пузырей форели  
 Fig. 3. Chromatogram for molecular-mass distribution of hydrolysis products of trout swim bladders

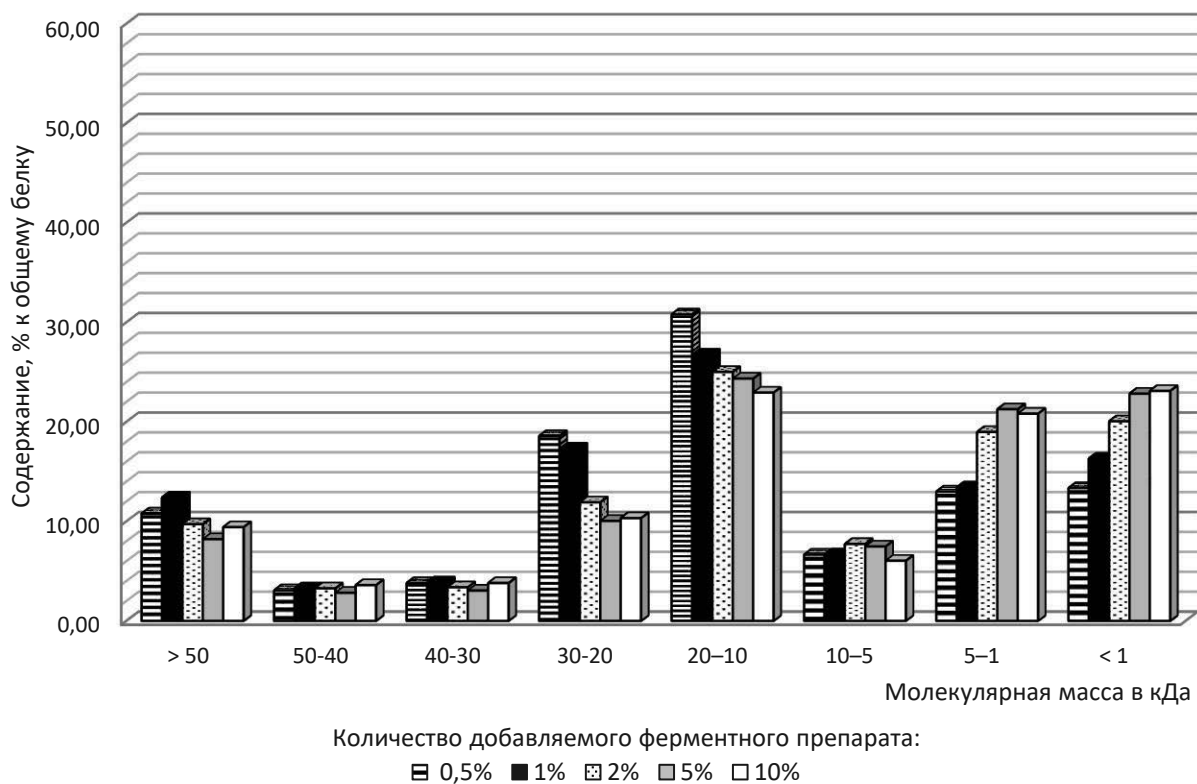


Рис. 4. Молекулярно-массовое распределение продуктов гидролиза плавательных пузырей леща  
 Fig. 4. Molecular-mass distribution of hydrolysis products of bream swim bladders

При воздействии ферментного препарата из форели снижается количество фрагментов с молекулярными массами 10–20, 20–30 и 30–40 кДа. Обращает на себя внимание преобладание средномолекулярных фракций с молекулярной массой 10–20 кДа.

В экспериментах зафиксировано значительное разрушение субстрата, который практически весь распадался при концентрации фермента 2% и выше. При этом гидролизат становился равномерным, густым, было невозможно отделить от жидкой фракции плотный остаток.

Следовательно, использовать для гидролиза плавательных пузырей форели более 2% ферментного препарата нецелесообразно.

Обнаруженная высокая эффективность разрушения плавательных пузырей форели вызвала необходимость проведения аналогичного эксперимента с плавательными пузырями леща при концентрациях фермента от 0,5% до 10%. Однако, эксперимент показал, что плавательные пузыри леща значительно труднее разрушаются исследуемым ферментом (рис. 4).

Как видно из диаграммы, показанной на рис. 4, в этих ферментолизатах также присутствуют все фракции с молекулярными массами от <1 кДа до >50 кДа. Но при всех концентрациях фермента остается достаточно много белков с молекулярными массами > 50 кДа. Преобладает фракция с молекулярной массой 20–10 кДа, а также велика фракция 30–20 кДа. Соответственно уменьшилось по сравнению с плавательными пузырями форели количество соединений с молекулярными массами <1 кДа и 5–1 кДа (на уровне 15–20% от всех белков, в гидролизатах из плавательных пузырей форели эти фракции достигают 30–58%). Следовательно, деградация измельченных плавательных пузырей леща проходит менее интенсивно при всех концентрациях ферментного препарата (от 0,5 до 10%).

Даже при концентрации 10% в гидролизатах остается много белков во фракции 20–10 кДа. При достаточно высоком количестве фракций <1 кДа и 5–1 кДа в значительных количествах сохраняются фрагменты с молекулярными массами 10–20 и 20–30 кДа по сравнению с данными, полученными для плавательных пузырей форели, где количество белков с такой молекулярной массой не превышало 7,5% и 2% соответственно, а фрагменты с молекулярными массами < 1 кДа и 5–1 кДа превышали 15% и 25% от общего количества белка.

Полученные результаты нуждаются в дополнительном объяснении, требуется проведение дополнительных исследований. Безусловно, на степень гидролиза оказывают влияние свойства и структура субстрата. Плавательные пузыри леща по сравнению с плавательными пузырями форели более плотные, эластичные, толщина стенок у них 0,5 мм. За счет этого уменьшается площадь контакта фермента с поверхностями измельченного субстрата и протеолиз протекает менее интенсивно. Увеличение эффекта гидролиза наблюдается с увеличением концентрации фермента, о чем свидетельствует снижение количеств белков с одинаковой молекулярной массой с ростом концентрации, при этом фракции <1 кДа и 1–5 кДа соответственно возрастают (см. рис. 4).

Таким образом, исследования показали, что кишечники с желудками форели пресноводной ручьевой являются перспективным сырьем для выделения гидролитических ферментных препаратов. Ферментный препарат

из кишечников форели имеет в своем составе коллагеназу, пепсин, трипсин, химотрипсин и липазу. Способность расщеплять коллаген делает его пригодным для производства коллагеновых гидролизатов, которые в настоящее время весьма популярны. Выбирая коллагеносодержащий субстрат вторичного рыбного сырья и уточняя соответственно температурно-временные параметры, можно изготавливать гидролизаты с заданным молекулярно-массовым составом.

### Заключение

Вторичное сырье (кишечники с желудками), собираемое при разделке форели пресноводной ручьевой (объекта аквакультуры), является перспективным материалом для выделения ферментных препаратов. Для выделения ферментных препаратов из пищеварительных органов речной форели применима разработанная ранее технология ферментных препаратов из пищеварительных органов рыб судака и леща: экстракция ферментов буферными растворами с соответствующими рН в течение 3,5 часов при температуре 37 °С, отделение и очистка ферментсодержащего раствора центрифугированием при 4000 об/мин;

В комплексе ферментов из пищеварительных органов форели обнаруживаются протеазы коллагеназы, пепсин, трипсин, химотрипсин и липаза. Ферментный комплекс способен гидролизовать мясное сырье и коллагенсодержащее рыбное сырье.

Гидролиз мясного сырья (фарша говядины) наиболее эффективно под действием фермента из кишечников форели проходит при рН 7,0.

Для гидролиза плавательных пузырей форели количество используемого фермента не должно превышать 2% к массе субстрата и буферного раствора. При такой концентрации ферментного препарата можно получать низкомолекулярные гидролизаты.

Эффективность гидролиза плавательных пузырей леща значительно ниже, эти плавательные пузыри более плотные, с большей толщиной стенок в сравнении с плавательными пузырями форели. Концентрация фермента в этом случае может быть на уровне 5%. Плавательные пузыри леща целесообразно использовать для получения коллагеновых гидролизатов со средней молекулярной массой.

Методом препаративной гель-проникающей хроматографии в ферментном препарате из пищеварительных органов форели обнаружено пять фракций протеаз и три фракции липаз, отличающихся молекулярными массами.

При гель-проникающей хроматографии ферменты с близкими молекулярными массами разделились недостаточно хорошо. Целесообразно продолжить эксперименты по подбору оптимальных условий для разделения всех фракций протеаз и липаз.

### Литература

1. Римарева Л. В., Серба Е. М., Соколова Е. Н., Борщчева Ю. А., Игнатова Н. И. Ферментные препараты и биокаталитические процессы в пищевой промышленности // Вопросы питания. 2017. Т. 86. № 5. С. 63–74.

### References

1. Rimareva L. V., Serba E. M., Sokolova E. N., Borshcheva Yu. A., Ignatova N. I. Enzyme preparations and biocatalytic processes in the food industry. *Nutrition issues*. 2017. T. 86. No. 5. pp. 63–74. (in Russian)

2. Антипова Л. В., Дунченко Н. В. Химия пищи. СПб: Издательство Лань, 2020. 856 с.
3. Мезенова О. Я., Тишлер Д., Агафонова С. В., Мезенова Н. Ю., Волков В. В., Бараненко Д. А., Гримм Т., Ридель С. Исследование и рациональное применение пептидных и липидных композиций, получаемых при гидролизной переработке коллагенсодержащих тканей // Вестник Международной академии холода. 2021. № 1. С. 46–58. DOI: 10.17586/1606-4313-2021-20-1-46-58
4. Антипова Л. В., Горбунков М. В. Физико-химические и биокаталитические свойства протеолитического комплекса препарата «Протепсин» // Вестник ВГУИТ. 2016. № 1. С. 89–95.
5. Гарбуз С. А., Забодалова Л. А. Методы получения биологически активных пептидов путем гидролиза молочных белков // Естественные и технические науки. 2018. № 12 (116). С. 79–81.
6. Zabodalova, L. A., Belozerova M. S., Evstigneeva T. N. Manufacturing of curd products of increased biological value for the elderly from dried components // ACTA scientiarum polonorum, technologia alimentaria. 2018. Vol. 17. No 2. P. 177–184.
7. Смирнова И. А., Гутков Н. Ю., Юртишкина А. В. Изучение фракционного состава молочно-белковых концентратов с целью их применения в производстве молочных продуктов // Техника и технология пищевых производств. 2017. Т. 45. № 2. С. 69–74.
8. Смирнова И. А., Гутков Н. Ю., Лукин А. А. Изучение состава молочно-белковых концентратов // Техника и технология пищевых производств. 2018. Т. 48 № 1. С. 85–90.
9. Римарева Л. В., Фурсова Н. А., Соколова Е. Н., Волчкова Г. С., Борщева Ю. А., Серба Е. М., Кривова А. Ю. Биодеструкция белков зернового сырья для получения новых хлебобулочных изделий // Вопросы питания. 2018. Том 87. № 6. С. 67–74.
10. Абрамова И. А., Серба Е. М. Биотехнологические процессы в технологиях продуктов питания и кормов // Пищевая промышленность. 2019. № 4. С. 12–14.
11. Серба Е. М., Абрамова И. М., Римарева Л. В., Оверченко М. Б., Игнатова Н. И., Грунин Е. А. Влияние ферментных препаратов на технологические показатели зернового сула и качество спирта // Пиво и напитки. 2018. № 1. С. 50–54.
12. Витол Н. С., Милешкина Е. П. Протеолитические ферментные препараты в биотрансформации продуктов переработки зерновых и бобовых культур / Сборник материалов VI международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика», Ялта (Крым), 17–21 сентября 2018 г. Актуальная биотехнология. 2018. № 3 (26). С. 306–310.
13. Пивненко Т. Н., Ковалев Н. Н., Запорожец Т. С. Ферментативные гидролизаты из гидробионтов Тихого океана как основа для создания биологически активных пищевых добавок и функциональных продуктов питания. Владивосток: Дальнаука, 2015. 159 с.
14. Боева Н. П., Дяченко М. М., Артемова А. Г. Научное обоснование технологических параметров процесса ферментации отходов рыбоперерабатывающих предприятий // Труды ВНИРО. 2016. Т. 163. С. 137–148.
15. Максимова С. Н., Слуцкая Т. Н., Полещук Д. В., Пономаренко С. Ю., Полещук В. И. Использование биорегуляторов протеолиза растительного происхождения в технологии пресервов // Известия КГТУ. 2018. № 48. С. 112–118.
16. Самойлова Д. А., Цибизова М. Е. Вторичные ресурсы рыбной промышленности как источник пищевых и биологически
2. Antipova L. V., Dunchenko N. V. Chemistry of food. Saint Petersburg: Lan Publishing House. 2020. 856 p. (in Russian)
3. Mezenova O. Ya., Tischler D., Agafonova S. V., Mezenova N. Yu., Volkov V. V., Baranenko D. A., Grimm T., Riedel S. Research and rational use of peptide and lipid compositions obtained by hydrolysis processing of collagen-containing tissues. *Journal of International Academy of Refrigeration*. 2021. No 1. p. 46–58. DOI: 10.17586/1606-4313-2021-20-1-46-58 (in Russian)
4. Antipova L. V., Gorbunkov M. V. Physico-chemical and biocatalytic properties of the proteolytic complex of the drug «Protepsin». *Vestnik VGUIT*. 2016. No. 1. p. 89–95. (in Russian)
5. Garbuz S. A., Zabodalova L. A. Methods obtaining biologically active peptides by hydrolysis of milk proteins. *Natural and technical Sciences*. 2018. No 12 (116). pp. 79–81. (in Russian)
6. Zabodalova, L. A., Belozerova M. S., Evstigneeva T. N. Manufacturing of curd products of increased biological value for the elderly from dried components. *ACTA scientiarum polonorum, technologia alimentaria*. 2018. Vol. 17. No 2. pp. 177–184. (in Russian)
7. Smirnova I. A., Gutov N. Yu., Yurtishkina A. V. The study of the fractional composition of milk-protein concentrates for the purpose of their use in the production of dairy products. *Technique and technology of food production*. 2017. Vol. 45. No. 2. pp. 69–74. (in Russian)
8. Smirnova I. A., Gutov N. Yu., Lukin A. A. Studying the composition of milk-protein concentrates. *Technique and technology of food production*. 2018. Vol. 48 No. 1. pp. 85–90. (in Russian)
9. Rimareva L. V., Fursova N. A., Sokolova E. N., Volchkova G. S., Borshcheva Yu. A., Serba E. M., Krivova A. Yu. Biodestruction of proteins of grain raw materials for the production of new bakery products. *Nutrition issues*. 2018. Vol. 87, No. 6, pp. 67–74. (in Russian)
10. Abramova I. A., Serba E. M. Biotechnological processes in food and feed technologies. *Food industry*. 2019. No. 4. pp. 12–14. (in Russian)
11. Serba E. M., Abramova I. M., Rimareva L. V., Overchenko M. B., Ignatova N. I., Grunin E. A. Influence of enzyme preparations on technological indicators of grain wort and alcohol quality. *Beer and beverages*. 2018. No. 1. pp. 50–54. (in Russian)
12. Vitol N. S., Milesheva E. P. Proteolytic enzyme preparations in biotransformation of grain and legume processing products. *Actual biotechnology*. Voronezh, 2018. № 3 (26). pp. 306–310 (*Collection of materials of the VI International Scientific and Practical Conference «Biotechnology: science and practice»*, Yalta (Crimea), September 17–21, 2018). (in Russian)
13. Pivnenko T. N., Kovalev N. N., Zaporozhets T. S. Enzymatic hydrolysates from hydrobionts of the Pacific Ocean as a basis for the creation of biologically active food additives and functional food products. Vladivostok: Dalnauka, 2015. 159 p. (in Russian)
14. Boeva N. P., Dyachenko M. M., Artemova A. G. Scientific substantiation of the technological parameters of the fermentation process of fish processing enterprises waste. *Proceedings of VNIRO*. 2016. Vol. 163. pp. 137–148. (in Russian)
15. Maksimova S. N., Slutskaia T. N., Poleshechuk D. V., Ponomarenko S. Yu., Poleshechuk V. I. The use of plant-derived proteolysis bioregulators in the technology of preserves. *Izvestiya KSTU*, 2018. No. 48. pp. 112–118. (in Russian)
16. Samoylova D. A., Tsibizova M. E. Secondary resources of the fishing industry as a source of food and biologically active

- чески активных добавок // Вестник АГТУ. Серия: «Рыбное хозяйство». 2015. № 2. С. 129–136.
17. Бредихина О. В., Зарубин Н. Ю. Разработка комплексной технологии переработки органических отходов рыбоперерабатывающих предприятий на коллагенсодержащие гидролизаты пищевого назначения // Труды ВНИРО. 2019. Т. 176. С. 109–121.
  18. Широнина А. Ю. Совершенствование технологии протеолиза рыбных белков и изучение коллоидно-химических свойств гидролизатов / Дисс. на соискание ученой степени к. т. н. Мурманск. 2015. 158 с.
  19. Ramakrishnan V. V., Ghaly A. E., Brooks M. S. and Budge S. M. Extraction of Oil from Mackerel Fish Processing Waste using Alcalase Enzyme Enz. 2013. 2: 2 1000115.
  20. Самойлова Д. А., Цибизова М. Е. Внутренности пресноводных рыб как перспективный источник биологически активных липидных комплексов D // Вестник МГТУ. 2015. Том 18. № 4. С. 654–660.
  21. Пивненко Т. Н., Ю. М. Позднякова, Ковалев А. Н. Исследование способов получения низкомолекулярного коллагена из медузы ропилемы *rhophilema asamushi* // Научные труды Дальрыбвтуза. 2017. Т. 43. С. 74–82.
  22. Максимова С. Н., Полежаев Д. В., Верещагина К. А., Суровцева Е. В., Милованов А. В. Обоснование способа переработки отходов от разделки промысловых дальневосточных крабов // Актуальные проблемы освоения биологических ресурсов Мирового океана. 2020. С. 59–62.
  23. Максимова С. Н., Шадрина Е. В., Богданов В. Д., Панчешина Е. М. Ферментативный гидролиз морских звезд с использованием различных протеаз. // V Международный Балтийский морской форум. Материалы VI международной научно-технической конференции «Пищевая и морская биотехнология». Калининград. 2017. С. 1388–1391.
  24. Майорова А. В., Сысеев Б. Б., Новикова Ю. А., Ханалиева И. А. Коллагеназы в медицинской практике: Современные средства на основе коллагеназы и перспективы их совершенствования // Фармация и фармакология. 2019. Т. 7, выпуск 5. С. 260–280.
  25. Байдалинова Л. С., Баженов Е. А. Исследования активности протеолитических ферментов в органах пищеварения пресноводных рыб // Вестник науки и образования Северо-Запада России. 2018. Т. 4. № 3.
  26. Baydalina L. S., Bazhenov E. A., Grimm T. Technology for the production of proteolytic enzymes from the digestive organs of freshwater fish in north-west Russia // Conf. Series: Earth and Environmental Science 689 (2021) 012030 IOP Publishing doi:10.1088/1755–1315/689/1/0120301.
  27. Grimm T. Comprehensive determination of the fermentative activity of the Pankreas Powder European Pharmacopoeia 8.0. Topics. 01. 2011. 0350. 2957–2958.
  28. Караулова Е. П., Чекасова А. И., Слуцкая Т. Н., Шульгина Л. В., Якуш Е. В. Антирадикальный эффект низкомолекулярных пептидов экстрактов и гидролизатов тканей гидробионтов // Известия ТИНРО. 2015. Т. 182. С. 269–278.
  29. Аюшин Н. Б., Караулова Е. П., Чекасова А. И., Слуцкая Т. Н. Отходы переработки дальневосточных голотурий как сырье для получения биологически активных добавок к пище // Известия ТИНРО. 2016. т. 186. С. 238–246.
  30. Смирнова И. А., Готов Н. Ю., Юртишкина А. В. Идентификация фракций белков молочно-белковых концентратов с использованием величины молекулярного веса // Техника additives. *Vestn. Astrakhan State Technical University un-ta. Ser. Fisheries*. 2015. No. 2. pp. 129–136. (in Russian)
  17. Bredikhina O. V., Zarubin N. Yu. Development of a complex technology for processing organic waste from fish processing enterprises into collagen-containing hydrolysates for food purposes. *Proceedings of VNIRO*. 2019. Vol. 176. pp. 109–121. (in Russian)
  18. Shironina A. Yu. Improving the technology of proteolysis of fish proteins and the study of colloidal-chemical properties of hydrolysates. *Dissertation for the degree of Candidate of Technical Sciences*. Murmansk. 2015. 158 p. (in Russian)
  19. Ramakrishnan V V, Ghaly A E, Brooks M S and Budge S M 2013 Excess of Oil from Mackerel Fish Processing Waste using Alcalase Enzyme Enz. Eng. 2: 2 1000115.
  20. Samoilova D. A., Tsibizova M. E. The insides of freshwater fish as a promising source of biologically active lipid complexes D. *Bulletin of MSTU*, 2015. Vol. 18, No. 4. pp. 654–660. (in Russian)
  21. Pivnenko T. N., Yu. M. Pozdnyakova, Kovalev A. N. Investigation of the ways of obtaining low-molecular collagen from the jellyfish *rhophilema rhophilema asamushi*. *Scientific works of Dalrybvtuz*. 2017. Volume:43. pp:74–82. (in Russian)
  22. Maksimova S. N., Poleschchuk D. V., Vereshchagina K. A., Surovtseva E. V., Milovanov A. V. Substantiation of the method of processing waste from the cutting of industrial Far Eastern crabs. *Actual problems of the development of biological resources of the World Ocean*. 2020. pp. 59–62.
  23. Maksimova S. N., Shadrina E. V., Bogdanov V. D., Panchishina E. M. Enzymatic hydrolysis of starfish using various proteases. *V International Baltic Marine Forum. Materials of the VI International Scientific and Technical conference «Food and Marine Biotechnology»*. Kaliningrad. 2017. pp. 1388–1391. (in Russian)
  24. Mayorova A. V., Sysuev B. B., Novikova Yu. A., Khanaliev I. A. Collagenases in medical practice: Modern collagenase-based drugs and prospects for their improvement. *Pharmacy and Pharmacology*. 2019. Vol. 7, issue 5. pp. 260–280. (in Russian) (in Russian)
  25. Baidalina L. S., Bazhenov E. A. Studies of the activity of proteolytic enzymes in the digestive organs of freshwater fish. *Bulletin of Science and education of the North-West of Russia*. 2018. V. 4 N 3. (in Russian)
  26. Baydalina L. S., Bazhenov E A. and Grimm Th. Technology for the pro-duction of proteolytic enzymes from the digestive organs of freshwater fish in north-west Russia. *Conf. Series: Earth and Environmental Science* 689 (2021) 012030 IOP Publishing doi:10.1088/1755–1315/689/1/0120301.
  27. Grimm T. Comprehensive determination of the fermentative activity of the Pankreas Powder European Pharmacopoeia 8.0. Topics. 01. 2011. 0350. 2957–2958.
  28. Karaulova E. P., Chekpasova A. I., Slutskaya T. N., Shulgina L. V., Yakush E. V. Antiradical effect of low molecular weight peptides of extracts and hydrolysates of tissues of hydrobionts. *Izvestiya TINRO*. 2015, Vol. 182. pp. 269–278. (in Russian)
  29. Ayushin N. B., Karaulova E. P., Chekpasova A. I., Slutskaya T. N. Waste from processing of Far Eastern holothurians as raw materials for obtaining biologically active food additives. *Izvestiya TINRO*. 2016, volume 186. pp. 238–246. (in Russian)
  30. Smirnova I. A., Gutov N. Yu., Yurtishkina A. V. Identification of protein fractions of milk protein concentrates using

- и технология пищевых производств. 2015. Т. 1. № 2 (3). С. 303–305.
31. Chemicals P. F. Sephadex gel filtration in theory and practice Pharmacia Fine Chemicals Inc. Appelbergs Boktryckeri Uppsala, Sweden. 1970.
  32. Sephadex-Ionenaustauschen Leitfaden zur Ionenaustausch-Chromatographie Pharmacia Fine Chemicals. Appelbergs Uppsala Sweden. 1970
  33. ГОСТ 20264.2. — 88. Препараты ферментные. Методы определения протеолитической активности. М.: Издательство стандартов, 1988. 14 с.
  - the molecular weight //Equipment and technology of food production. 2015. vol. 1. No. 2 (3). pp. 303–305. (in Russian)
  31. Chemicals P. F. Sephadex gel filtration in theory and practice Pharmacia Fine Chemicals Inc. Appelbergs Boktryckeri Uppsala, Sweden. 1970.
  32. Sephadex-Ionenaustauschen Leitfaden zur Ionenaustausch-Chromatographie Pharmacia Fine Chemicals. Appelbergs Uppsala Sweden. 1970.
  33. State standard 20264.2. — 88. Enzyme preparations. Methods for determining proteolytic activity. Moscow, Publishing House of Standards. 1988. 14 p.

### Сведения об авторах

#### Баженов Елисей Александрович

Аспирант кафедры пищевой биотехнологии Калининградского государственного технического университета, 236022, Россия, Калининград, Советский пр., 1, ya.elisey2013@yandex.ru

#### Байдалинова Лариса Степановна

К. т. н., профессор кафедры пищевой биотехнологии Калининградского государственного технического университета, 236022 Россия, Калининград, Советский пр., 1, larisa.baydalinaova@klgtu.ru

#### Гримм Томас

Директор биотехнологической компании ANiMOX, Германия 12489, Берлин, ул. Макса Планка, t.grimm@animox.de

### Information about authors

#### Bazhenov Elisei A.

3rd year PhD student of the Department of food biotechnology of Kaliningrad State Technical University, 236022 Russia, Kaliningrad, Sovetskiy pr. 1, ya.elisey2013@yandex.ru

#### Baydalinaova Larisa S.

Ph. D., Professor of the Department of Food Biotechnology of Kaliningrad State Technical University, 236022 Russia, Kaliningrad, Sovetskiy pr. 1, larisa.baydalinaova@klgtu.ru

#### Grimm Thomas

Director Biotechnologie Geschäftsführer ANiMOX GmbH, 12489 Berlin Deutschland Max-Planck-Straße 3, t.grimm (at) animox.de



Статья доступна по лицензии  
Creative Commons «Attribution-NonCommercial»

# Peterfood

15-17 ноября 2022

КВЦ Экспофорум

Тел.: +7(812) 327-49-18

Главная продовольственная выставка Северо-Запада – единственная в стране, обеспечивающая экспонентам гарантированный контакт с закупщиками сетей непосредственно на стендах.

#### Разделы выставки:

- Мясные изделия. Мясо. Птица. Яйцо.
- Рыба и морепродукты.
- Овощи. Фрукты. Грибы. Ягоды.
- Замороженные продукты. Полуфабрикаты.
- Молочная продукция. Сыры.
- Бакалея (зернопродукты, макаронные изделия, специи)
- Эко- и биопродукты. Здоровое питание.
- Кондитерская продукция.
- Снэки, орехи, сухофрукты.
- Алкогольные и безалкогольные напитки.
- Чай. Кофе.
- Консервы, соусы, кетчупы, специи.
- Салон оборудования и услуг.
- Мед и продукты пчеловодства.
- Стеклотара и упаковка.

#### Оргкомитет выставки:

ООО «КВК Империя-Форум»  
Тел./ф.: 8 (812) 327-49-18, (495) 730-79-06  
E-mail: imperia@imperiaforum.com, press@imperiaforum.com  
<http://peterfood.ru/>