

УДК 577.151.63

Технология производства протеолитических ферментов из пищеварительных органов рыб прибрежного рыболовства Северо-Западного региона

Е. А. БАЖЕНОВ¹, канд. техн. наук Л. С. БАЙДАЛИНОВА¹, Т. ГРИММ²

¹Калининградский государственный технический университет

²Биотехнологическая компания ANiMOX GmbH

E-mail: ya.elisey2013@yandex.ru

В статье представлены обций химический состав и активность протеолитических ферментов пищеварительных органов рыб Северо-Западного региона (леща и судака) в различные периоды года при различных pH. На основе полученных данных выделение ферментов из пищеварительных органов леща произведено при pH 9,5, судака — при pH 2,5. Предложена технологическая схема процесса производства протеолитических ферментных препаратов из вторичного сырья рыб Северо-Западного региона. Исследование протеолитической активности полученных препаратов показало эффективность предложенной технологии при выбранных режимах и в оптимальные периоды года. Эксперименты по уточнению технологии в биотехнологической компании ANiMOX GmbH, Германия показали возможность экстрагирования ферментов при температуре 35 °С. Проведена очистка ферментных препаратов ионообменной хроматографией с использованием ионообменников (Q-XL и SP-XL). Методом эксклюзионной (гель-проникающей) хроматографии с использованием Sephadex G-75 Superfine определена молекулярная масса ферментов в препаратах.

Ключевые слова: протеолитические ферменты, судак, леЩ, вторичное сырье, пищеварительные органы рыб, параметры процесса выделения ферментов, ионообменная хроматография, гель-проникающая хроматография, молекулярная масса.

Информация о статье:

Поступила в редакцию 11.10.2022, одобрена после рецензирования 12.01.2023, принята к печати 23.01.2023

DOI: 10.17586/1606-4313-2023-22-1-66-77

Язык статьи — русский

Для цитирования:

Баженов Е. А., Байдалинова Л. С., Гримм Т. Технология производства протеолитических ферментов из пищеварительных органов рыб прибрежного рыболовства Северо-Западного региона. // Вестник Международной академии холода. 2023. № 1. С. 66–77. DOI: 10.17586/1606-4313-2023-22-1-66-77

Technology of proteolytic enzymes production from the digestive organs of fish of coastal fisheries in the North-Western region

E. A. BAZHENOV¹, Ph. D. L. S. BAYDALINOVA¹, T. GRIMM²

¹Kaliningrad State Technical University,

²Biotechnology company ANiMOX GmbH

E-mail: ya.elisey2013@yandex.ru

The article presents the general chemical composition and activity of proteolytic enzymes of fish digestive organs of the Northwestern region (bream and walleye) in different periods of the year at different pH. Based on the data obtained, enzymes were isolated from the digestive organs of bream at pH 9.5 and walleye at pH 2.5. A technological scheme for the production process of proteolytic enzyme preparations from secondary raw materials of fish of the North-Western region is proposed. The study of the proteolytic activity of the obtained preparations showed the effectiveness of the proposed technology under the selected regimes and during optimal periods of the year. Experiments to refine the technology in the ANiMOX GmbH biotech company (Germany) have shown the possibility of extracting enzymes at a temperature of 35 °C. The enzyme preparations were purified by ion exchange chromatography using ion exchangers (Q-XL and SP-XL). The molecular weight of enzymes in the preparations was determined by the method of exclusive (gel-penetrating) chromatography using Sephadex G-75 Superfine.

Keywords: proteolytic enzymes, pike perch, bream, secondary raw materials, fish digestive organs, parameters of the enzyme isolation process, liquid high-efficiency chromatography, gel-penetrating chromatography, molecular weight.

Article info:

Received 11/10/2022, approved after reviewing 12/01/2023, accepted 23/01/2023

DOI: 10.17586/1606-4313-2023-22-1-66-77

Article in Russian

For citation:

Bazhenov E. A., Baydalinova L. S., Grimm T. Technology of proteolytic enzymes production from the digestive organs of fish of coastal fisheries in the North-Western region. *Journal of International Academy of Refrigeration*. 2023. No 1. p. 66–77. DOI: 10.17586/1606-4313-2023-22-1-66-77

Введение

Биологические катализаторы (ферменты, или энзимы) находят широкое применение в различных отраслях промышленности. Расширяется их использование в пищевой промышленности при производстве различных продуктов. Комплексная программа развития биотехнологий в Российской Федерации предусматривает значительное увеличение производства ферментов. Для использования в пищевой промышленности интерес представляют три подкласса гидролаз: эстеразы, гликозидазы и протеазы. Большим спросом в пищевой промышленности сегодня пользуются протеолитические ферменты. Они используются для различных целей: для ферментативного гидролиза биомассы дрожжей с целью создания функциональных добавок к пище и продуктов функционального питания [2], ферментативной модификации побочного мясокостного коллагенсодержащего сырья [3] и вторичного рыбного сырья [4], переработки отходов от разделки промысловых крабов [5], для ферментативной обработки нетрадиционных водных объектов [6], для выделения биологически активных пептидов и создания функциональных продуктов, в том числе для спортивного питания, из вторичного рыбного сырья [7], для получения пищевых и функциональных продуктов на основе коллагенсодержащего рыбного сырья [8], для получения рыбных белковых гидролизатов пищевого назначения [2], при переработке молочного, мясного и рыбного сырья [8]–[12], при переработке кератинсодержащего сырья, мясных и рыбных отходов с целью производства кормовых продуктов.

Используются ферментные препараты из растительного сырья (папаин, фицин, бромелин), препараты из ферментсодержащих органов сельскохозяйственных животных (пепсин, трипсин, панкреатин, коллагеназа, липаза и др.). Многочисленные ферменты и в больших количествах содержатся в промысловых водных объектах (рыбы, ракообразные, моллюски, водоросли). Основное место локализации ферментов — пищеварительные органы — желудок, кишечник, панкреас и печень. И в перечне этих ферментов первые места занимают протеолитические ферменты, липаза, коллагеназа.

Широкий спектр ферментов различного профиля для биоконверсии сырья растительного и животного происхождения позволяет получать микробиологический синтез. Но потребность в ферментах из природных источников до сих пор существует и даже возрастает.

Важным источником для производства ферментных препаратов являются отходы от разделки рыб. Это вторичное сырье включает основные ферментсодержащие части — пищеварительные органы желудка, кишечника, панкреас, печень. Сырье доступно и дешево. Преобладающим

в исследованиях до настоящего времени являлось использование океанического сырья. Но в последнее время на береговых рыбоперерабатывающих предприятиях развивается глубокая разделка рыб. Это создает перспективу использования вторичного рыбного сырья прибрежного рыболовства для производства целевых продуктов различной направленности, в том числе ферментных препаратов.

В результате использования органов пищеварения рыб для производства ферментных препаратов с максимально возможным сохранением протеолитических ферментов, складываются элементы комплексной переработки вторичного рыбного сырья. Поскольку в Российской Федерации вторичное рыбное сырье (органы пищеварения, чешуя, внутренности рыб и других объектов) используется в недостаточной степени, задача разработки технологий, направленных на комплексную переработку водных биоресурсов, является актуальной. В связи с этим актуальны исследования по разработке и обоснованию технологий производства ферментных препаратов из органов пищеварения рыб Северо-Западного региона России.

В Калининградском государственном техническом университете (КГТУ) на кафедре пищевой биотехнологии проведены исследования по технологии получения протеолитических ферментных препаратов из пищеварительных органов двух видов промысловых рыб — судака и леща. Данные объекты различаются по строению пищеварительной системы и характеру питания. Судак является активным хищником и имеет четко сформированный желудок. Его можно собирать и использовать отдельно для выделения ферментных препаратов или перерабатывать вместе с кишечником. У леща желудок представляет собой расширенную переднюю часть кишечника, отдельно он не выделяется. Весь процесс пищеварения у леща осуществляется в различных частях кишечника. Поэтому судак и лещ имеют ферментные комплексы, активные при разных уровнях активной кислотности. При заготовке сырья печень судака удаляется, у леща выделить при разделке печень не представляется возможным.

Выделение ферментов осуществляется методом экстракции. Условия процесса должны обеспечивать полноту выделения ферментов и сохранение их активности.

Для обеспечения актуального процесса необходимо было изучить особенности химического состава пищеварительных органов судака и леща, активность их ферментов и температурные и временные параметры процесса получения ферментных препаратов.

Важным показателем для характеристики ферментов является их молекулярная масса, по значениям которой можно определить принадлежность ферментов к тому или иному классу.

Цель и задачи исследования

Целью настоящего исследования является изучение химического состава органов пищеварения рыб судак и лещ, активности их протеолитических ферментов, определение температурно-временных параметров на этапе выделения ферментов для сохранения максимальной активности, создание технологии производства протеолитических ферментных препаратов, разделение ферментов за счет их связывания с ионообменным материалом хроматографической колонки, избирательного элюирования с возрастающей концентрацией противоионов, сбор для исследования индивидуальных ферментов, определение молекулярной массы ферментов.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи.

1. Изучение химического состава органов пищеварения рыб, изучение активности ферментов органов пищеварения в зависимости от активной кислотности среды.
2. Разработка технологической схемы производства ферментного препарата.
3. Уточнение параметров (определение оптимальных температуры и продолжительности экстракции) процесса на этапе выделения ферментов.
4. Оценка эффективности полученного экспериментального образца ферментного препарата.

Материалы и методы исследования

Серия исследований по изучению химического состава и активности ферментов пищеварительных органов рыб, уточнению температурно-временных параметров процесса экстракции ферментов, по разделению и очистке ферментов ионообменной и гель-проникающей хроматографией, определению молекулярной массы индивидуальных ферментов была проведена на кафедре пищевой биотехнологии КГТУ и в Биотехнологической компании ANiMOX GmbH (Берлин, Германия).

В качестве сырья использовали пищеварительные органы судака и леща, собиравшиеся при разделке рыб на рыбоперерабатывающем комплексе «За Родину» (пос. Взморье, Калининградская обл.). Поступившее свежее сырье сразу использовалось для исследований или замораживалось и хранилось до эксперимента при температуре не выше $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Химический состав сырья (массовые доли воды, сухих веществ, жира, белка и минеральных веществ) определяли в измельченных после предварительного замораживания пробах в соответствии с ГОСТ 7636–85.

Протеолитическую активность ферментов определяли модифицированным методом протеазного анализа (метод Ансона) [13, 14]. Модификация заключалась в проведении гидролиза субстрата при $35\text{ }^{\circ}\text{C}$. Инкубация раствора казеината натрия с исследуемым ферментным раствором проводилась в течение 30 мин до образования пептидов и аминокислот при разных pH (2,5; 5,5; 7,2; 9,5). Ферментативную активность оценивали по количеству тирозина в продуктах гидролиза, не осаждаемых трихлоруксусной кислотой. Активность определяли, используя скорректированную абсорбцию (280 нм) для испытуемой пробы — разницу величин абсорбций между опытным и контрольным образцами с учетом их разбавления (ед/г).

Активность в экспериментальных образцах ферментных препаратов при различных pH определяли в соответствии с ГОСТ 20264.2–88.

Эффективность экстрагирования ферментов из измельченного сырья определяли по результатам соответствующих экспериментов при соотношениях сырья и буферных растворов 1:1 и 1:2, буферные растворы имели pH 2,5; 7,2 и 9,5, продолжительность экстрагирования изменялась от 1 до 5 ч при температурах $35\text{--}50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Результаты оценивались по содержанию сухих веществ в экстрактах и в остающихся плотных остатках и активности экстрагированных протеаз.

Для повышения эффективности экстрагирования и увеличения выхода готового продукта проводилось дополнительное тонкое измельчение сырья миксером, а также повторное экстрагирование ферментов из отделяемых плотных остатков при соотношении 1:2.

Для очистки комплексного ферментного препарата проводилось разделение и связывание ферментов ионообменной хроматографией (хроматограф марки «Pharmacia»). Использовались катионные и анионные ионообменники [15]–[17]. Определение абсорбции белка во фракциях, элюируемых с ионообменников, производилось спектрофотометром UV-3100 марки «VWR».

Определение молекулярной массы проводилось с применением эксклюзионной гель-проникающей хроматографии на установке Merck-Hitachi LaChrom (L-7000 Serie) с программным обеспечением, позволяющим рассчитывать молекулярную массу полимеров (ферментов) по величинам абсорбций в элюируемых фракциях и времени их удерживания. Молекулярные массы ферментов рассчитывались с использованием стандартов для гель-проникающей хроматографии Bio-Rad Gel Filtration Standard (cat #151-1901) с компонентами с известными молекулярными массами: альбумин (говядина, 69 кДа), овальбумин (курица, 44 кДа), миоглобин (лошадь, 17 кДа), витамин B_{12} (1,350 кДа). Расчеты производились программным обеспечением в системе Excel. Отчеты о результатах (PDF) отражались и сохранялись на ВЭЖХ-компьютере. Оценка производилась системой Excel по всем фракциям каждой пробы, на основании которых формировались и сохранялись таблицы с результатами и диаграммы хроматограмм.

Результаты и их обсуждение

Общий химический состав органов пищеварения рыб судака и леща представлен в табл. 1.

За счет накопления резервного поверхностного жира содержание его в органах пищеварения рыб высокое (от 10,66% зимой в феврале до 25,55% в октябре-ноябре). Это вызвало необходимость специально удалять вручную с поверхности пищеварительных органов жир во время пробоподготовки. Такая обработка сказалась на результатах (табл. 1), но содержание жира даже при ручном удалении поверхностного жира оставалось высоким в течение всего года (10,1–14,56% для судака и 10,12–13,2% для леща) [13].

В органах пищеварения — желудка и кишечника рыб высокое содержание белка (15,28–18,68%), в том числе ферментативно активных соединений. Изменение активности протеолитических ферментов в пищевари-

Таблица 1

Общий химический состав органов пищеварения рыб в разные месяцы 2020 г.

Table 1

The general chemical composition of fish digestive organs in different months of the 2020

Время вылова рыб	Содержание, %			
	Вода	Жир	Белок	Минеральные вещества (зола)
Судак				
Февраль	71,95	11,10*	15,90	1,05
Апрель	73,61	10,1**	15,28	0,86
Июнь	67,69	14,56**	16,86	0,89
Август-сентябрь	69,71	11,48**	17,76	1,05
Октябрь-ноябрь	63,42	25,28*	10,44	0,86
Декабрь	72,87	10,26**	16,19	0,68
Лещ				
Февраль	70,45	10,66*	16,82	1,09
Апрель	68,59	13,2**	15,89	0,96
Июнь	73,33	9,9**	16,68	0,95
Август-сентябрь	70,22	10,22**	18,68	0,98
Октябрь-ноябрь	60,5	25,50*	13,0	1,04
Декабрь	71,9	10,12**	17,05	0,87

* органы пищеварения с поверхностным жиром;

** пищеварительные органы после удаления поверхностного жира при пробоподготовке.

тельных органах судака в течение года, при различных уровнях pH представлено на рис. 1, в пищеварительных органах леща — на рис. 2.

Полученные результаты показывают, что в органах пищеварения и судака, и леща присутствуют кислые, слабокислые, нейтральные и щелочные протеазы. Протеолитическая активность варьирует в зависимости от физиологического состояния рыбы. Судак питается крупными объектами и имеет хорошо развитый желудок. В течение года максимальная активность в его пищеварительных органах (желудок с кишечником) отмечается в кислой и слабокислой зонах (pH 2,5 и 5,5). Только в ноябре у судака в зоне щелочного pH зафиксирована достаточно высокая активность при низкой активности в кислой зоне.

У леща, использующего для питания другие более мелкие объекты и имеющего желудок в виде расширения передней части кишечника, максимальная активность протеаз определяется в щелочном диапазоне (pH 8,0–9,5).

Наибольшая протеолитическая активность наблюдается в период интенсивного питания рыб, которое проходит с мая по сентябрь. Именно в это время целесообразно производить сбор сырья для выделения ферментов. Однако, высокая жирность органов пищеварения в этот период усложняет технологический процесс выделения ферментов и требует кроме ручного отделения поверхностного жира дополнительного извлечения жировой фракции из получаемого экстракта.

На основании проведенных исследований была разработана технологическая схема процесса производства протеолитических ферментов из пищеварительных органов судака и леща.

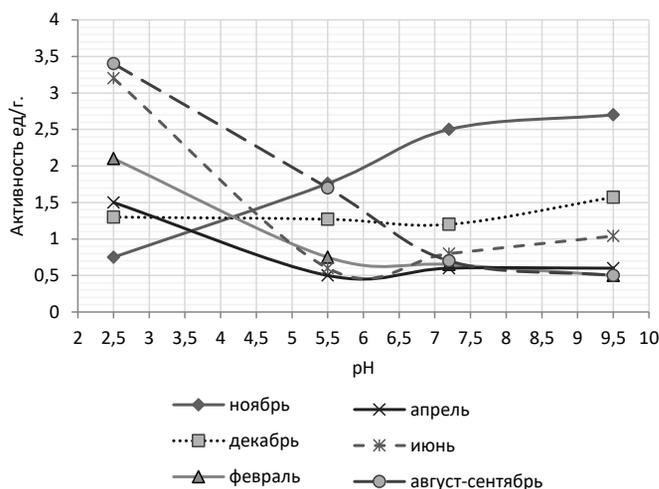


Рис. 1. Изменение активности протеолитических ферментов в пищеварительных органах судака (желудки с кишечником) в течение года при различных уровнях pH

Fig. 1. Changes in the activity of proteolytic enzymes in the digestive organs of pike perch (stomachs with intestines) during the year at different pH levels

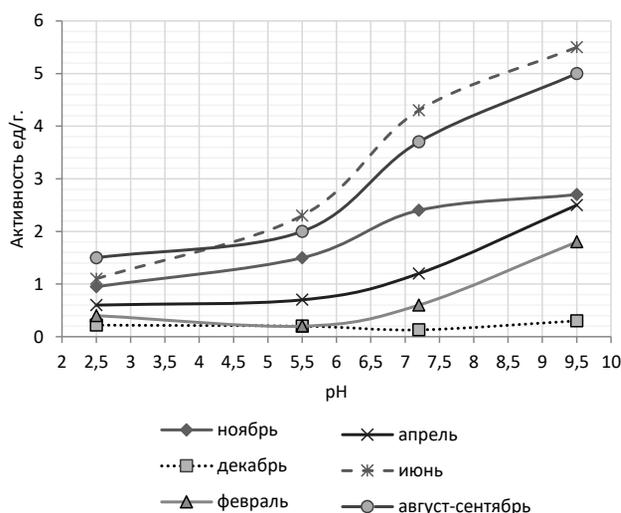


Рис. 2. Изменение активности протеолитических ферментов в пищеварительных органах леща (кишечники) в течение года при различных уровнях pH

Fig. 2. Changes in the activity of proteolytic enzymes in the bream's digestive organs (intestines) during the year at different pH levels

При определении оптимальных параметров процесса проведено математическое моделирование с использованием ортогонального центрального композиционного плана (ОЦКП) второго порядка для двух факторов. В качестве изменяемых факторов были выбраны продолжительность и температурный режим термостатирования. Отклики — активность выделенных ферментов и масса непрореагировавшего остатка. Моделирование использовалось для двух уровней pH, при которых осуществляется процесс — 2,5 для выделения ферментов из органов пищеварения судака и 9,5 для органов пищеварения леща.

В результате проведенного моделирования были получены следующие параметры процесса экстрагирования ферментов из пищеварительных органов рыб (табл. 2).

Таблица 2
Параметры процессов экстрагирования ферментов из пищеварительных органов судака и леща

Table 2
Parameters of enzyme extraction processes from the digestive organs of walleye and bream

Объект исследования	Параметры процесса экстрагирования ферментов	
	Температура, °С	Продолжительность процесса, ч
Пищеварительные органы судака	38	5,5
Пищеварительные органы леща	43	5,0

Технологическая схема производства протеолитических ферментных препаратов из пищеварительных органов рыб показана на рис. 3.

В рамках стипендии немецкого экологического фонда в Биотехнологической компании ANiMOX GmbH (Берлин, Германия) проведены дополнительные исследования, которые позволили испытать другие технологические параметры процесса производства ферментных препаратов на этапе выделения ферментов из вторичного рыбного сырья (температура и продолжительность экстракции).

Диапазон параметров при экстрагировании ферментов из органов пищеварения судака и леща (продолжительность, ч; температура экстракции, °С), показаны в табл. 3.

Результаты эксперимента показывают, что наибольшая активность при соотношении обрабатываемого материала судака и буферного раствора 1:1 обеспечивалась при температуре 35 °С и продолжительности экстраги-

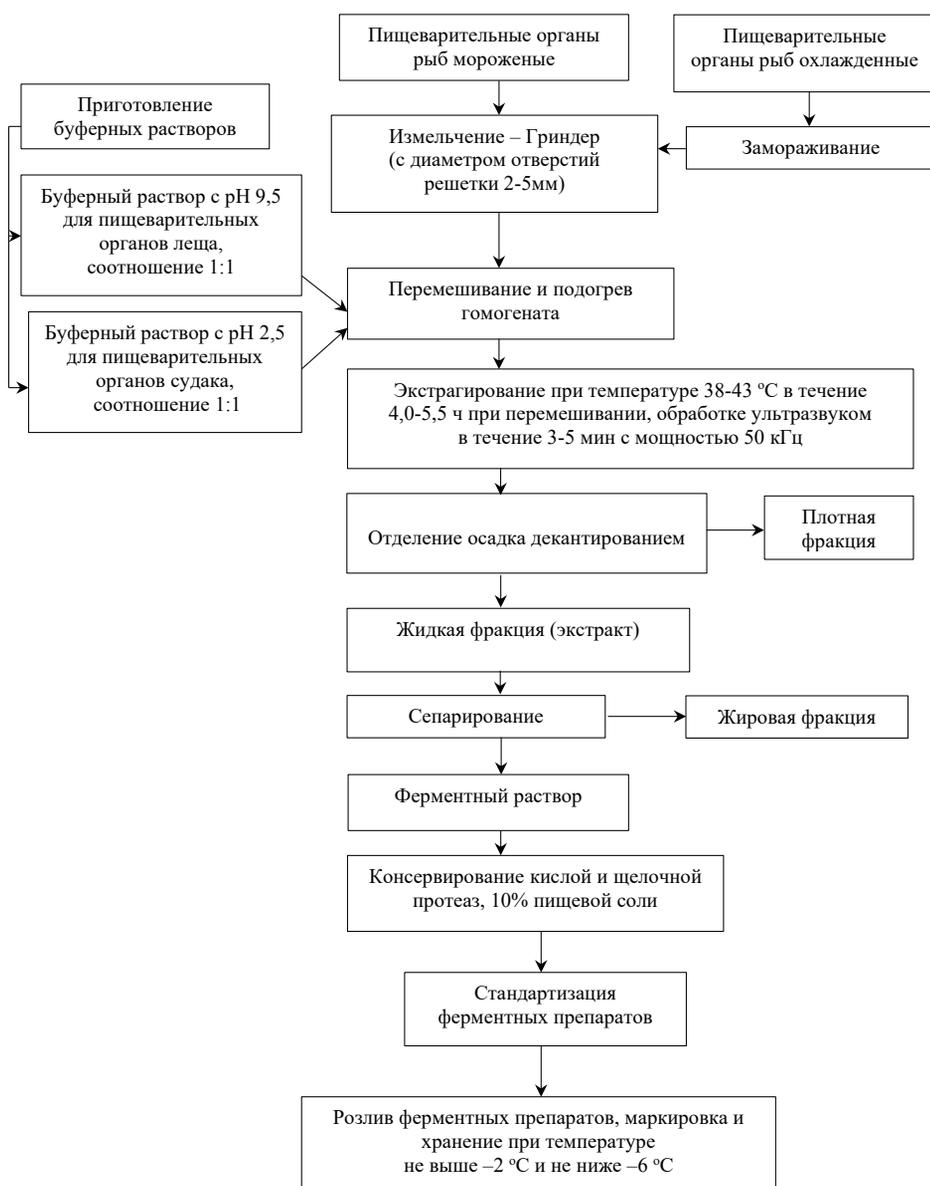


Рис. 3. Технологическая схема производства ферментных препаратов из пищеварительных органов рыб судака и леща
Fig. 3. Technological scheme of production of enzyme preparations from the digestive organs of fish walleye and bream

Таблица 3

Обзор вариантов при определении продолжительности и температуры экстракции при выделении протеаз из органов пищеварения судака и леща

Table 3

Options for determining the duration and temperature of extraction during the isolation of proteases from the digestive organs of walleye and bream

Номера экспериментов	Использованный материал	Условия процесса экстракции ферментов		Соотношение используемого материала и буферного раствора		Протеазная активность жидкого препарата, ед./г
		Продолжительность, ч	Температура, °С	Масса материала, г	Масса буферного раствора, г / рН	
1	Судак (желудок)	1,0	35	18,0347	18,0/2,5	1,83
2	Судак (желудок)	3,0	35	15,0225	15,0/2,5	1,87
3	Судак (желудок)	5,0	35	15,1632	15,0/2,5	1,87
4	Судак (желудок)	5,0	35	16,6809	17,0/2,5 Осаждение фермента 75%-ным изопропанолом	1,5 (сухой фермент)
5	Судак (желудок), экстракция с использованием миксера	3,0	35	25,0	25,0/2,5	1,75
5 (1)	Судак (желудок), экстракция с использованием миксера	3,0	35	25,0	25,0/2,5	1,74
6	Судак (желудок)	3,0	35	20,0	20,0/2,5	1,73
6 (1)	Судак (желудок) экстракция с использованием миксера	3,0	35	20,0	20,0/2,5	1,68
7	Судак (желудок), экстракция с использованием миксера	3,0	35	25,0	25,0/2,5	1,74
8	Лещ (кишечник), экстракция с использованием миксера	4,0	35	25,0	25,0/9,5	2,23

рования 3–5 ч. Этот режим может быть рекомендован в технологический процесс. Однако, протеолитическая активность в получаемых экстрактах оказалась ниже, получавшихся по режимам, указанным в технологической схеме (рис. 3).

В процессе исследований установлено, что в плотном остатке после отделения экстракта еще содержится достаточно большое количество ферментов. Для дополнительного извлечения их было проведено повторное экстрагирование ферментов из плотных остатков образцов 5 и 6. После отделения ферментного раствора нерастворившиеся остатки смешивались с новыми порциями буферного раствора при соотношении 1:2. Результаты показали, что и после второй экстракции ферменты все еще остаются в обрабатываемом материале. Можно считать, что в технологический процесс производства ферментных препаратов целесообразно включить двойную экстракцию. Однако, увеличение при двойной экстракции продолжительности процесса, дополнительные энергозатраты, образование больших объемов экстрактов создаст значительные трудности в процессах дальнейшей обработки. Большинство исследователей считают, что при использовании сырья с невысокой стоимостью добиваться полного извлечения из него ферментов нецелесообразно.

Дополнительное измельчение материала миксером не только не увеличило выхода ферментов в раствор, но в отдельных пробах (образец 6 (1)) даже понизило его, что может быть связано с образованием при такой обработке густой однородной суспензии и невозможностью извлечения из нее раствора ферментсодержащих белков.

Следовательно, измельчение материала миксером в технологический процесс не включается.

Эксперимент 4 показал, что не рекомендуется осаждать ферменты изопропанолом, поскольку при этом активность протеаз сильно снижается.

Оценить эффективность экстрагирования ферментов можно путем учета количества сухих веществ в исходном материале и в получаемых экстрактах и плотных остатках. Результаты экспериментов, показывающие количество сухих веществ в растворах ферментов и в остатках, приведены в табл. 4. Количество извлекаемого белка — фермента рассчитывалось как отношение в процентах массы сухих веществ в ферментном растворе к общей массе сухих веществ в остатке и в растворе.

Наибольшая доля сухих веществ, содержащих ферменты, найдена в пробах 4 и 7. Из этого следует, что параметры экстракции 4–5 ч и при температуре 35 °С подходят для производства ферментных препаратов из органов пищеварения судака и леща.

Очистка и разделение ферментов экспериментальных образцов препаратов проводились ионообменной хроматографией с использованием ионообменников (анионообменника Q-XL и катионообменника SP-XL).

Катионный ионообменник представляет собой Sepharose SP-XL, сильноокислый катионообменник с сульфопропильной группой, использующий Na^+ или K^+ в качестве ионов с положительным зарядом. Анионный ионообменник представляет собой Sepharose Q-XL, сильноосновной анионообменник с сульфопропильной группой, использует ион PO_4^{3-} в качестве иона с отрицательным зарядом [17]–[19].

Таблица 4

Характеристики процессов экстракции ферментов при различных условиях

Table 4

Characteristics of enzyme extraction processes under various conditions

Номера экспериментов*	Ферментные растворы			Нерастворившиеся остатки			Количество извлеченного сухого вещества, содержащего фермент, %
	Сухие вещества в ферментном растворе, %	Масса ферментного раствора г	Масса сухих веществ в растворе фермента, г	Сухие вещества в остатке, %	Масса остатка, г	Масса сухих веществ в остатке, г	
1	5,40%	13,8324	0,747	14,65%	18,7213	2,742	21,4
2	6,07%	12,2886	0,746	16,13%	12,4751	2,012	27,0
3	6,88%	13,5348	0,932	16,80%	13,4148	2,254	29,2
4	6,37%	19,7334	1,257	15,54%	14,3742	2,234	36,0
5	7,29%	17,7986	1,298	16,89%	16,4072	2,771	31,9
6	7,06%	15,1207	1,068	15,39%	13,4506	2,069	34,0
5 (1)	4,50%	1,8774	0,084	17,89%	1,6339	0,292	22,4
6 (1)	4,48%	1,9538	0,088	23,24%	0,9855	0,229	27,7
7	6,68%	22,5947	1,509	14,96%	18,0652	2,703	35,8
8	8,86%	19,7208	1,747	19,79%	16,7825	3,321	34,5

*Номера экспериментов соответствуют образцам, указанным в табл. 3.

Таблица 5

Количество выполненных тестов, условия и результаты разделения ферментов

Table 5

The number of tests performed; conditions and results of enzyme separation

Образцы ферментов	Материал	Разведение образца	Номер хроматограммы	Материал колонки	pH	Количество пиков на хроматограмме
Standart-Test	Альбумин	1:100	CH-01-03	SP-XL Sepharose	6,0	1
Standart-Test	Альбумин	1:100	CH-04	SP-XL Sepharose	6,0	1
Standart-Test	Альбумин	1:100	CH-05	SP-XL Sepharose	5,0	1
7 (1)	Судак (желудок)	1:10	CH-06	SP-XL Sepharose	5,0	1
7 (2)	Судак (желудок)	1:10	CH-07	SP-XL Sepharose	4,0	3
7 (3)	Судак (желудок)	1:10	CH-08	SP-XL Sepharose	6,0	2
8 (1)	Лещ (кишечник)	1:10	CH-09	SP-XL Sepharose	6,0	2
8 (2)	Лещ (кишечник)	1:10	CH-10	Q-XL Sepharose	8,0	3
8 (3)	Лещ (кишечник)	1:10	CH-11	Q-XL Sepharose	8,0	3

При исследованиях применен хроматограф марки «Pharmacia», спектрофотометр UF-3200 марки «Esoview».

Целью данных экспериментов было связать ферменты с ионообменным материалом, затем избирательно элюировать их с возрастающей концентрацией противоионов, собрать и исследовать фракции, как отдельные чистые ферменты.

При исследованиях с использованием ионообменных материалов связывание и элюирование ферментов из пищеварительных органов судака проводили ионообменной хроматографией в кислых условиях и в качестве материала колонки использовали SP XL Sepharose. Использовали фосфатный буфер с концентрацией 0,01 моль/дм³ в диапазоне pH 4–6. В табл. 5 показаны результаты работ по ионообменной хроматографии. В качестве стандарт-теста использовался альбумин с известной молекулярной массой. Для каждого эксперимента были созданы хроматограммы с фиксированием пиков протеаз, неактивных белков и пептидов.

Данные табл. 5 показывают, что количество пиков при различных pH изменяется. Наибольшее количество

пиков для судака получено при pH 4,0 (образец 7 (2)). На рис. 4 в качестве примера показана хроматограмма этого эксперимента. Использовали фосфатный буфер с pH 4,0, поскольку ферменты активны в кислой зоне pH. Для разделения белков колонку диаметром 1 см и длиной 30 см заполняли на 10 см анионным материалом (SP-XL Sepharose). После уравнивания колонки вносили образец 7 (2), разбавленный фосфатным буферным раствором с pH 4,0, в соотношении 1:10. Затем выполнялась программа элюирования раствором NaCl с увеличивающимся градиентом концентрации.

Сбор проб проводился в течение 5 мин/пробу, при этом в каждую пробу собиралось по 5 см³. Процесс элюирования продолжался 2,5 ч. В эксперименте 7 (2) на рис. 4 видны 3 пика. Первый пик содержит несвязанный фермент, который элюируется из колонки в первую очередь, два других пика соответствуют ферментам в связанном состоянии. При непрерывном градиенте ионной силы раствора NaCl два пика связанных ферментов элюируются в последовательности, которая соответствует их возрастающей электрофоретической миграции к аноду.

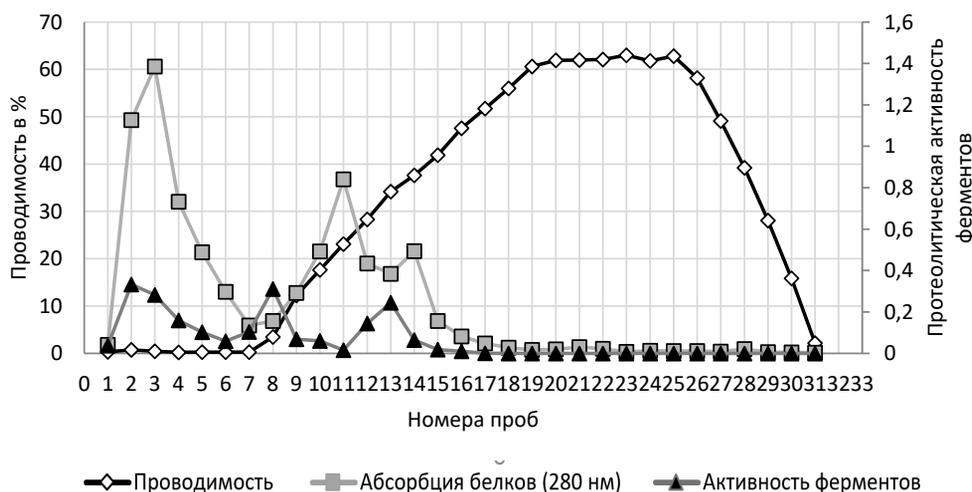


Рис. 4. Схема элюирования и разделения ферментов из желудка судака на SP-XL- Sepharose. Стартовый буфер: 0,01 моль/дм³ фосфатный буферный раствор с рН 4,0, элюирование раствором хлорида натрия с градиентом концентрации от 0,1 М до 1,0 М и его проводимости. Скорость потока: 1 см³/мин

Fig. 4. Scheme of elution and separation of enzymes from the stomach of walleye on SP-XL- Sepharose. Starting buffer: 0.01 mol/dm³ phosphate buffer solution with pH 4.0, elution with sodium chloride solution with a concentration gradient from 0.1 M to 1.0 M and its conductivity. Flow rate — 1 cm³/min

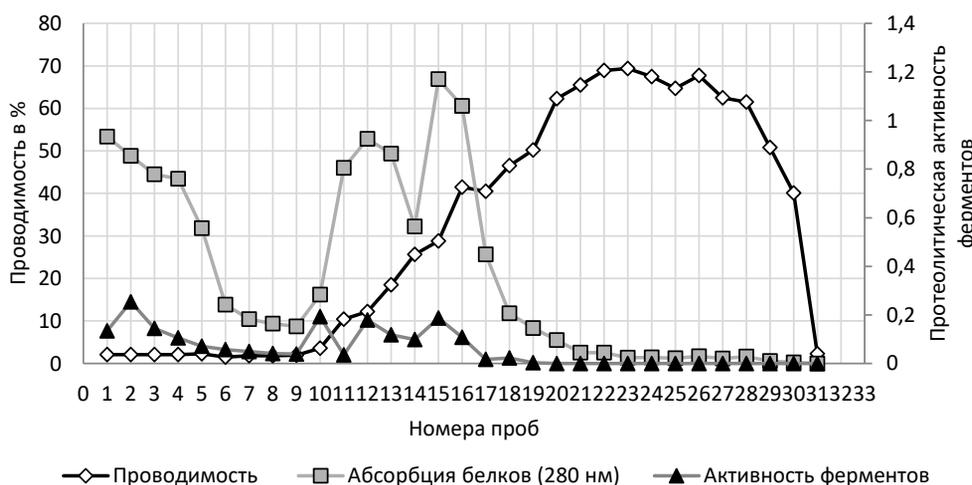


Рис. 5. Схема элюирования при разделении ферментов из пищеварительных органов леща на QXL- Sepharose. Стартовый буфер: 0,01 моль/дм³ фосфатный буферный раствор с рН 8,0, элюирование фосфатным буферным раствором с раствором хлорида натрия с градиентом концентрации от 0,1 М до 1,0 М и его проводимости. Скорость потока: 1 см³/мин

Fig. 5. Elution scheme during the separation of enzymes from the digestive organs of bream into QXL- Sepharose. Starting buffer: 0.01 mol/dm³ phosphate buffer solution with pH 8.0, elution with phosphate buffer solution with sodium chloride solution with concentration gradient from 0.1 M to 1.0 M and its conductivity. Flow rate — 1 cm³/min

Исследование с использованием ионообменного материала Q-XL Sepharose было проведено для связывания и элюирования различных белковых фракций жидкого ферментного препарата из органов пищеварения леща. Использовали фосфатный буфер с концентрацией 0,01 моль/дм³ с рН 8,0. Колонку диаметром 1 см и длиной 30 см на 10 см заполняли катионным материалом Q-XL-Sepharose и вносили образцы 8 (2) и 8 (3), которые разбавляли фосфатным буферным раствором с рН 8,0 в соотношении 1:10. Хроматограмма для образца 8 (2) представлена на рис. 5.

Сбор каждой пробы производился в течение 5 мин, при этом в каждую пробу собиралось по 5 см³ элюата. Процесс элюирования занял 2,5 ч. В хроматограмме экс-

перимента 8 (2) на рис. 4 по абсорбции белка также видны 4 пика. Первый пик содержит несвязанный фермент, который в первую очередь элюируется непосредственно из колонки, два других пика показывают ферменты в связанном состоянии. При непрерывном увеличении градиента ионной силы NaCl два пика связанных ферментов элюируются один за другим. Во втором пике фиксируются два фермента по активности.

Элюаты с активными ферментами были собраны, высушены методом сублимации и зарезервированы для дальнейшего детального исследования.

Обработка ферментных препаратов с помощью эксклюзионной хроматографии (гель-проникающей хроматографии) на Sephadex G-75 Superfine проводилась с це-

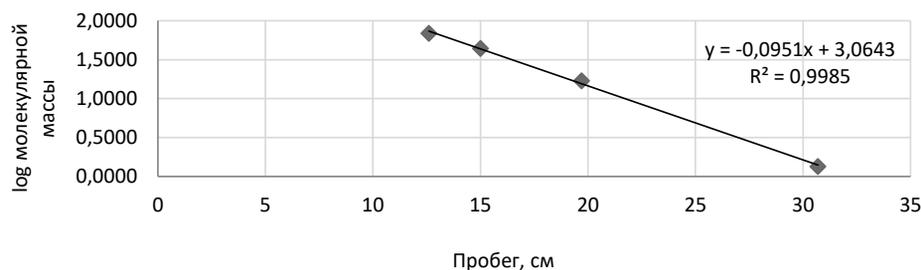


Рис. 6. Стандарты молекулярных масс (альбумин — 69 кДа; овальбумин — 44 кДа; миоглобин — 17 кДа; витамин В₁₂ — 1,35 кДа)

Fig. 6. Molecular weight standards (albumin — 69 kDa; ovalbumin — 44 kDa; myoglobin — 17 kDa; vitamin B₁₂ — 1,35 kDa)

люю определения молекулярной массы молекул. При эксклюзионной хроматографии (также известной как гель-проникающая хроматография, ГПХ) молекулы растворенных веществ могут быть разделены в зависимости от их размера (точнее, их гидродинамического объема), а не по молекулярной массе.

Эффект разделения основан не на процессе фильтрации, а на различных доступных размерах пор в геле для диффузии молекул разных размеров. Через крупные поры быстро проходят крупные молекулы. Пористые полимеры неподвижной фазы позволяют более мелким молекулам проникать внутрь их, что значительно увеличивает доступный для этих молекул диффузионный объем и, таким образом, увеличивает время их удерживания. Поэтому небольшие молекулы удерживаются дольше, чем большие. Более крупные молекулы быстрее проходят через хроматографическую колонку и находятся в более ранних фракциях элюата, тогда как более мелкие молекулы элюируются позже. Это делает метод сравнительно быстрым для выделения более крупных молекул [17]. При элюировании образцов с молекулами

разных размеров не удается полностью разделить очень большие и очень маленькие молекулы.

При разделении фракций белков методом эксклюзионной хроматографии использовали фосфатные буферы с концентрацией 0,1 моль /дм³, с рН 5,0 и 8,0. Перед началом разделения белков колонку, имеющую диаметр 1 см и длину 70 см, заполняли гелем Sephadex G-75 Superfine на высоту 65 см. После уравнивания колонки вносили неразбавленный образец в количестве 0,5 см³.

Для определения молекулярной массы на колонке сначала прогоняли стандарт маркерных полимеров Bio-Red Gel Filtration Standart (cat#1511901) с различными известными молекулярными массами.

Результаты хроматографирования стандартов молекулярных масс показаны на рис. 6, данные графика использовались для расчета молекулярной массы ферментов из органов пищеварения судака и леща.

Пик активных ферментов из пищеварительных органов леща (рис. 7) приходится на пробы от 16 до 25. Путем расчета с использованием специальной програм-

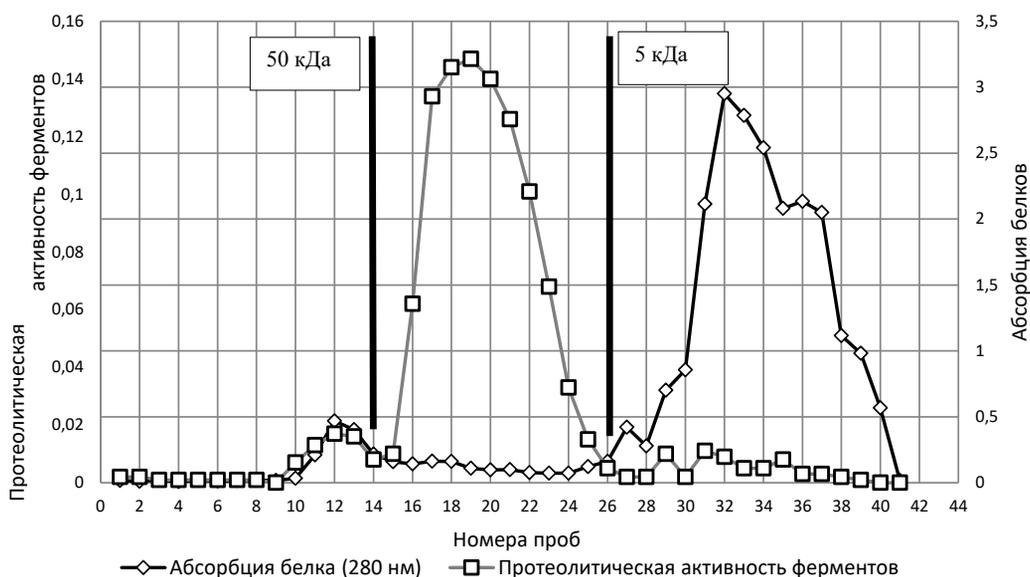


Рис. 7. Разделение ферментов из пищеварительных органов леща на Sephadex G-75 Superfine. Колонка 1,0×70 см. Буфер 0,1 М Na₂HPO₄ с рН 8,0. Скорость потока: 0,2 см³/мин. Сбор каждой пробы производился в течение 10 мин, в каждую пробу собиралось по 2 см³ элюата. Процесс элюирования продолжался 6,8 ч

Fig. 7. Separation of enzymes from the digestive organs of bream on Sephadex G-75 Superfine. Column filling: 1.0×70 cm. Buffer 0.1 M Na₂HPO₄ with pH 8.0. Flow rate: 0.2 cm³/min. Each sample was collected within 10 min, 2 cm³ of eluate was collected in each sample. The elution process lasted for 6.8 hours

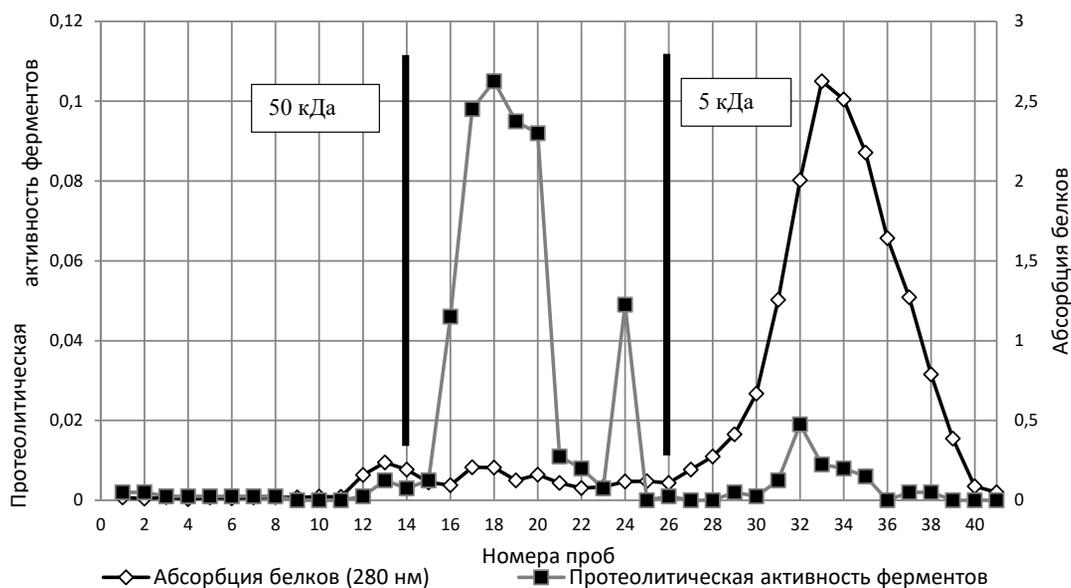


Рис. 8. Разделение ферментов из пищеварительных органов судака на Sephadex G-75 Superfine. Колонка: 1,0×70 см. Буфер 0,1 М КН₂РO₄ с рН 5. Скорость потока: 0,2 см³/мин. Сбор каждой пробы продолжался 10 мин, в каждую пробу собиралось по 2 см³ элюата. Процесс элюирования продолжался 6,8 ч

Fig. 8. Separation of enzymes from the digestive organs of walleye into Sephadex G-75 Superfine. Column filling: 1.0×70 cm. The buffer is 0.1 M КН₂РO₄ with a pH of 5. Flow rate: 0.2 cm³/min. The collection of each sample lasted 10 min, 2 cm³ of eluate was collected in each sample. The elution process lasted for 6.8 hours

мы определено, что молекулярная масса этого фермента составляет около 22,5 кДа. Это означает, что в пищеварительной системе леща есть ферменты, которые имеют молекулярную массу, подобную эластазе и химотрипсину, и гидролизуют белки в щелочном диапазоне. В исходном образце также присутствует высокомолекулярный пептид. В собранных при элюировании элюатах оказывается высокоочищенный фермент со значительно меньшим количеством примесей.

Как видно на рис. 8, пик активного фермента из пищеварительных органов судака включает фракции от 15 до 21. Расчет показывает, что молекулярная масса фермента около 29,5 кДа. Это означает, что в пищеварительной системе судака есть ферменты, сходные по молекулярной массе с ферментами пепсина и гидролизующие белки в кислом диапазоне рН. И в этом эксперименте в собранных элюатах был раствор высокоочищенного фермента со значительно меньшим количеством примесей. На хроматограмме видно, что в исследуемом образце присутствует фракция с молекулярной массой менее 5 кДа, так же, как и у леща, присутствует высокомолекулярный пептид.

Таким образом, при данных экспериментальных работах обосновывались и уточнялись температурно-временные параметры процесса выделения ферментов из сырья, необходимые рН буферных растворов, режимы разделения фракций и отделения жира. Установлено, что предложенная ранее технологическая схема производства протеолитических ферментных препаратов из вторичного рыбного сырья Северо-Западного региона России (см. рис. 3) в основном подтверждена. Можно в качестве дополнения включить при необходимости режим выделения ферментов при температуре 35 °С в течение 3–4 ч.

Выводы

Вторичное рыбное сырье является источником ценных биологически активных веществ, в том числе протеаз, которые рационально извлекать щадящими экстракционными методами.

Заготовку протеазосодержащего ферментного сырья (органов пищеварения рыб судака и леща) лучше всего производить с апреля по сентябрь, так как в данный период эти органы рыб обладают наиболее высокой протеолитической активностью.

Наибольшая протеазная активность пищеварительных органов судака наблюдается в кислом диапазоне рН. Лещ обладает ферментативной активностью в щелочном диапазоне рН.

По результатам эксперимента можно заключить, что при производстве ферментных препаратов для увеличения их выхода целесообразно осуществлять повторную экстракцию, так как ферменты в большом количестве обнаружены в сырье после первой экстракции. Однако при обработке дешевого сырья удлинение процесса, повышение энергозатрат и получение больших объемов разбавленных экстрактов нельзя считать целесообразными. В технологический процесс включается одноразовая экстракция ферментов при соотношении сырье/буферный раствор — 1:1.

Проведены исследования состава и характеристик жидких ферментных препаратов, выделенных из пищеварительных органов судака и леща.

Эксперименты по ионообменной хроматографии показали, что ферменты из пищеварительных органов судака и леща не полностью связывались анионитами и катионитами. Однако некоторое разделение белковых фракций происходило.

Эксклюзионная гель-проникающая хроматография использована как дополнительный способ разделения и очистки протеаз, при которой осуществлено обнаружение, очистка и разделение протеаз, а также определе-

ны молекулярные массы протеаз. В качестве следующего этапа исследований целесообразно провести разделение ферментов с молекулярными массами >50 кДа и <50 кДа ультрафильтрацией.

Литература

1. Римарева Л. В., Серба Е. М., Соколова Е. Н., Борщева Ю. А., Игнатова Н. И. Ферментные препараты и биокаталитические процессы в пищевой промышленности // Вопросы питания. 2017. №86 (5). С. 63–74.
2. Пивненко Т. Н., Ковалев Н. Н., Запорожец Т. С. Ферментативные гидролизаты из гидробионтов Тихого океана как основа для создания биологически активных добавок к пище и продуктов функционального питания. Владивосток: Дальнаука, 2015. 159 с.
3. Мезенова Н. Ю., Агафонова С. В., Мезенова О. Я., Байдалинова Л. С., Волков В. В. Ферментативная модификация побочного мясокостного коллагенсодержащего сырья при его переработке // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2020. Том 10. № 2 (33). С. 314–324.
4. Мезенова О. Я. Биотехнологические способы получения протеиновых и белково-минеральных добавок из вторичного рыбного сырья заводильных производств. // Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. 2019. № 2–3 (368-369). С. 68–71.
5. Максимова С. Н., Полещук 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.
6. Максимова С. Н., Шадрина Е. В., Богданов В. Д., Панчишина Е. М. Ферментативный гидролиз морских звезд с использованием различных протеаз // V Международный Балтийский морской форум. 2017. С. 1388–1391.
7. Мезенова Н. Ю., Верхотуров В. В., Волков В. В., Байдалинова Л. С., Мезенова О. Я. Определение технологических показателей порошков биологически активных пептидов из рыбьей чешуи в составе биопродукта для спортивного питания. // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2016. Vol. 6. Issue 2. p. 104–114.
8. Мезенова О. Я., Волков В. В., Мерсель Т., Гримм Т., Кюн С., Хелинг А., Мезенова Н. Ю. Сравнительная оценка способов гидролиза коллагенсодержащего рыбного сырья при получении пептидов и исследование их аминокислотной сбалансированности. // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2018. Т. 8, № 4. С. 83–94.
9. Антипова Л. В., Подвигина Ю. Н., Косенко И. С. Применение ферментных препаратов в технологии производства мясных изделий. // Фундаментальные исследования. 2008. №6. С. 134–135.
10. Kritchenkov A. S., Egorov A. R., Yagafarov N. Z., Volkova O. V., Zabodalova L. A., Suchkova E. P., Khrustalev V. N. Efficient reinforcement of chitosan-based coatings for Ricotta cheese with non-toxic, active, and smart nanoparticles. // Progress in Organic Coatings. 2020. Vol. 145 p. 105707.
11. Kuznetsova L., Zabodalova L., Yakovchenko N., Domoroshchenkova M. The study of process of alternative fuel production from renewable raw materials. // Energy Procedia. 2016. Vol. 95. P. 230–236.

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. No. 86 (5). pp. 63–74. (in Russian)
2. 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 nutrition products. Vladivostok: Dalnauka, 2015. 159 p. (in Russian)
3. Mezenova N. Yu., Agafonova S. V., Mezenova O. Ya., Baidalinova L. S., Volkov V. V. Enzymatic modification of by-product meat-bone collagen-containing raw materials during its processing. *Izvestiya vuzov. Applied chemistry and biotechnology*. 2020. Vol. 10. No. 2 (33). pp. 314–324. (in Russian)
4. Mezenova O. Ya. Biotechnological methods for the production of protein and protein-mineral additives from secondary fish raw materials of smoking industries. *News of higher educational institutions. Food technology*. 2019. No. 2–3 (368-369). pp. 68–71. (in Russian)
5. Maksimova S. N., Poleschuk D. V., Vereshchagina K. A., Surovtseva E. V., Milovanov A. V. May Substantiate the method of processing waste from cutting commercial Far Eastern crabs. *Actual problems of development of biological resources of the World Ocean*. 2020. pp. 59–62. (in Russian)
6. Maksimova S. N., Shadrina E. V., Bogdanov V. D., Panchishina E. M. Enzymatic hydrolysis of starfish using various proteases. *V International Baltic Sea Forum*. 2017. pp. 1388–1391. (in Russian)
7. Mezenova N. Yu., Verkhotur V. V., Volkov V. V., Baidalinova L. S., Mezenova O. Ya. Determination of technological parameters of powdery active peptides from fish scales as part of bioproduct for sport nutrition] *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2016. Vol. 6. Issue 2. p. 104–114. (in Russian)
8. Mezenova O. Ya., Volkov V. V., Moersel T., Grimm T., Kuehn S., Hoehling A., Mezenova N. Yu. A comparative assessment of hydrolysis methods used to obtain fish collagen peptides and investigation of their amino acid balance. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2018. Vol. 8. Issue 4. P. 83–94. (in Russian)
9. Antipova L. V., Podvigina Yu. N., Kosenko I. S. The use of enzyme preparations in the production technology of meat products. *Fundamental research*. 2008. No. 6. pp. 134–135. (in Russian)
10. Kritchenkov A. S., Egorov A. R., Yagafarov N. Z., Volkova O. V., Zabodalova L. A., Suchkova E. P., Khrustalev V. N. Efficient reinforcement of chitosan-based coatings for Ricotta cheese with non-toxic, active, and smart nanoparticles. *Progress in Organic Coatings*. 2020. Vol. 145 p. 105707.
11. Kuznetsova L., Zabodalova L., Yakovchenko N., Domoroshchenkova M. The study of process of alternative fuel production from renewable raw materials. *Energy Procedia*. 2016. Vol. 95. P. 230–236.

12. 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. Eng.* 2013. 2:2: 1000115.
13. Байдалинова Л. С., Баженов Е. А. Исследования активности протеолитических ферментов пищеварительных органов пресноводных рыб // *Вестник науки и образования Северо-Запада России.* 2018. Т. 4. № 3.
14. Каверзнева Е. Д. Стандартный метод определения протеолитической активности для комплексных препаратов протеаз // *Прикладная биохимия и микробиология.* 1971. №7 (2). С. 225–228.
15. Grimm T. Comprehensive determination of the fermentative activity of the Pankreas Powder. // *European Pharmacopoeina.* 8.0 Topics 01. 2011. 0350. 2957–2958.
16. Chemicals P. F. Sephadex gel filtration in theory and practice. Pharmacia Fine Chemicals Inc. Appelbergs Boktryckeri. Uppsala, Sweden. 1970.
17. Sephadex-Ionenaustauschen. Leitfaden zur Ionenaustausch-Chromatographie. Pharmacia Fine Chemicals Appelbergs. Uppsala, Sweden. 1970.
12. 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. Eng.* 2013. 2:2: 1000115.
13. Baidalinova L. S., Bazhenov E. A. Studies of the activity of proteolytic enzymes of the digestive organs of freshwater fish. *Bulletin of Science and Education of the North-West of Russia.* 2018. V. 4. No 3. (in Russian)
14. Kaverzneva E. D. Standard method for determining proteolytic activity for complex protease preparations. *Applied biochemistry and microbiology.* 1971. No. 7 (2). pp. 225–228.
15. Grimm T. Comprehensive determination of the fermentative activity of the Pankreas Powder. *European Pharmacopoeina.* 8.0 Topics 01. 2011. 0350. 2957–2958.
16. Chemicals P. F. Sephadex gel filtration in theory and practice. Pharmacia Fine Chemicals Inc. Appelbergs Boktryckeri. Uppsala, Sweden. 1970.
17. Sephadex-Ionenaustauschen. Leitfaden zur Ionenaustausch-Chromatographie. Pharmacia Fine Chemicals Appelbergs. Uppsala, Sweden. 1970.

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.baydalinova@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

Baydalinova Larisa S.

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

О Перечне рецензируемых научных изданий

В связи с вступлением в силу новой редакции номенклатуры научных специальностей, по которым присуждаются ученые степени, утвержденной приказом Минобрнауки России от 24 февраля 2021 г. № 118, издано распоряжение Минобрнауки России от 1 февраля 2022 г. № 33-р о Перечне рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук.

Вестник Международной академии холода включен в Перечень рецензируемых научных изданий (по состоянию на 07.03.2023 г.) под № 467.

Подробная информация на сайте ВАК РФ в разделе "Документы" – "Рецензируемые издания"

https://vak.minobrnauki.gov.ru/documents#tab=_tab:editions~