

ТЕХНОЛОГИЯ ОБРАБОТКИ ГИДРОБИОНТОВ**УДК 597–1.05:577.15****О.П. Дворянинова, Л.В. Антипова, А.В. Соколов***

Воронежский государственный университет инженерных технологий,
394036, г. Воронеж, просп. Революции, 19

**ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ ПРУДОВЫХ РЫБ:
СПОСОБЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И СВОЙСТВА**

Рассмотрены способы выделения и исследованы свойства протеолитических ферментов мышечной ткани и внутренних органов прудовых рыб. Установлено, что эффективность ферментных процессов связана с физико-химической характеристикой ферментов, и прежде всего с их активностью и стабильностью. Показано, что ферменты мышечной ткани большинства прудовых рыб имеют кислый характер и проявляют максимальную активность при pH 4,5–5,0. Полученные данные о субстратной специфичности выделенного комплекса позволяют обосновать возможное использование его в различных направлениях биотехнологии. Ввиду ярко выраженного сродства к гидролизу водо- и солерастворимых белковых фракций перспективным направлением использования ферментных комплексов является их применение в технологии рыбных продуктов, например при посоле, в частности для сокращения времени созревания и улучшения органолептических показателей продукта.

Ключевые слова: биоресурсы, прудовые рыбы, мышечная ткань, ферментная система, внутренности, катепсины, протеолитическая активность, субстратная специфичность, термостабильность.

Dvoryaninova O.P., Antipova L.V., Sokolov A.V. Proteolytic enzymes of pond fish: methods of isolation and properties // *Izv. TINRO*. — 2016. — Vol. 187. — P. 245–253.

Methods of proteolytic enzymes isolation from muscle tissue and viscera of pond fish are viewed and their properties are investigated. Efficiency of enzymatic processes is determined by physical and chemical characteristics of the enzymes and, first of all, by their activity and stability. The cathepsins from muscle tissue of most pond fish are acidic and have the highest activity under pH 4.5–5.0. The substrate specificity of this enzyme complex predetermines its possible usage in pickling, particularly for reducing its time and improving organoleptic parameters of the product.

Key words: marine bioresources, pond fish, muscle tissue, enzyme system, viscera, cathepsin, proteolytic activity, substrate specificity, thermostability.

Введение

Проведенная систематизация исследований в области строения тканей, клеток и биополимеров прудовых рыб как объектов для производства продуктов широкого

* Дворянинова Ольга Павловна, доктор технических наук, декан, заведующая кафедрой, e-mail: olga-dvor@yandex.ru; Антипова Людмила Васильевна, доктор технических наук, профессор, e-mail: antipova.l54@ya.ru; Соколов Александр Викторович, кандидат технических наук, доцент, e-mail: sokol993@yandex.ru.

Dvoryaninova Olga P., D.Sc., dean, head of department, e-mail: olga-dvor@yandex.ru; Antipova Ludmila V., D.Sc., professor, e-mail: antipova.l54@ya.ru; Sokolov Alexander V., Ph.D., assistant professor, e-mail: sokol993@yandex.ru.

потребительского спроса показала, что в литературе отсутствует информация о биотехнологическом потенциале сырьевых аквакультурных ресурсов, в частности о свойствах лизосомных ферментов, знания о которых позволят управлять автолитическими процессами, а следовательно, качеством рыбопродуктов. Поэтому выделение комплекса катепсинов из мышечной ткани исследуемых видов рыб в аспекте дальнейшего развития рыбохозяйственного комплекса Российской Федерации актуально и целесообразно.

Цель исследования — научно обосновать и экспериментально подтвердить условия выделения комплекса протеолитических ферментов из мышечной ткани и внутренних органов прудовых рыб, описать их свойства, предложить варианты использования для интенсификации протеолиза.

Материалы и методы

Объектами исследования служили живые особи карпа, толстолобика, белого амура, сазана, щуки (ГОСТ 14896-81), свободные от паразитов (рачков и гельминтов), подвижные, упитанные, без отслаивания чешуи, ссадин, не имеющие порочащих запахов (ила, нефтепродуктов), выловленные в осенний период.

Сырье доставлялось из Павловского, Поворинского и Бобровского районов Воронежской области (соответственно рыбохозы ООО «Восход», ООО «Ильмень», ООО «Сухая Березовка»).

В работе использовались современные стандартные физические, химические, биохимические и микробиологические методы анализа сырья, а также модифицированные и усовершенствованные методики.

Для изучения протеолитической активности (ПА) ферментной системы мышечной ткани прудовых видов рыб была проведена серия экспериментов по определению константы автопротеолиза мышечной ткани и внутренних органов. Активность катепсинов мышечной ткани и ферментной системы внутренних органов определяли по известной методике (Николаенко, 2011).

Константа автопротеолиза (Антипова и др., 2015) определена по содержанию тирозина в подготовленной пробе до и после термостатирования при температуре 40 °C продолжительностью 1 ч.

Протеолитическая активность катепсинов мышечной ткани названных прудовых рыб была определена по вышеуказанной методике (Николаенко, 2011) при естественном значении pH, равном 6,0–6,5. Сущность метода заключается в получении экстракта катепсинов мышечной ткани и определении ПА катепсинов фотометрическим методом (Дворянинова, 2014).

Для выделения ферментного комплекса использовали схему: получение гомогената, фракционирование $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, гель-фильтрация на колонке Сефадекс G-25, ионно-обменная хроматография, гель-фильтрация на колонке с Сефадексом G-150. Очистку проводили при 0–4 °C в несколько стадий:

- получение гомогената в среде выделения (50 мМ трис-HCl буфер, pH 7,8–8,0; 3 мМ MgCl_2 , 1 мМ ЭДТА);

- фракционирование $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: в ферментную вытяжку добавляли сухой $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и перемешивали в течение 15 мин. Количество добавляемого $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ на объем вытяжки рассчитывали по таблице Гродзинского (Дворянинова и др., 2010). В процессе высаливания осуществляли постоянный контроль pH среды путем добавления 1 М раствора NaOH. Осадок отделяли центрифугированием в течение 40 мин при 8000 об⁻¹ и растворяли в 10 мМ трис-HCl буфере (pH 7,8), содержащем 1 мМ дитиотрейтола (ДТТ) (Грачева, 2000);

- гель-фильтрация на Сефадексе G-25 (medium) (Pharmacia, Sweden), который набухал не менее 3 ч в 5 мМ трис-HCl буфере, pH 7,5. Колонки хранили в холодильнике при температуре 2 °C с добавлением 0,5 мМ азида натрия;

- ионно-обменная хроматография на ДЭАЭ-фрактогеле: раствор комплекса ферментов наносили на колонку из ДЭАЭ-фрактогеля (1 × 20 см), уравновешенную тем же буфером, и элюировали фермент линейным градиентом KCl (от 0 до 200 мМ). Скорость элюции составила 0,3 мл/мин;

— для проведения процесса гель-фильтрации полученную фракцию наносили на колонку с Сефадексом G-150 (1,5 × 25,0 см) для очистки от высокомолекулярных примесей и элюировали со скоростью 0,5 мл/мин 10 мМ трис-НСl буфером, содержащим 1 мМ ДТТ.

Для определения фракционного состава полученного ферментного комплекса, выделенного из мышечной ткани карпа, были проведены электрофоретические исследования.

Результаты и их обсуждение

Значение константы автопротеолиза мышечной ткани и внутренних органов прудовых рыб показало, что наиболее активна ферментная система у толстолобика (табл. 1).

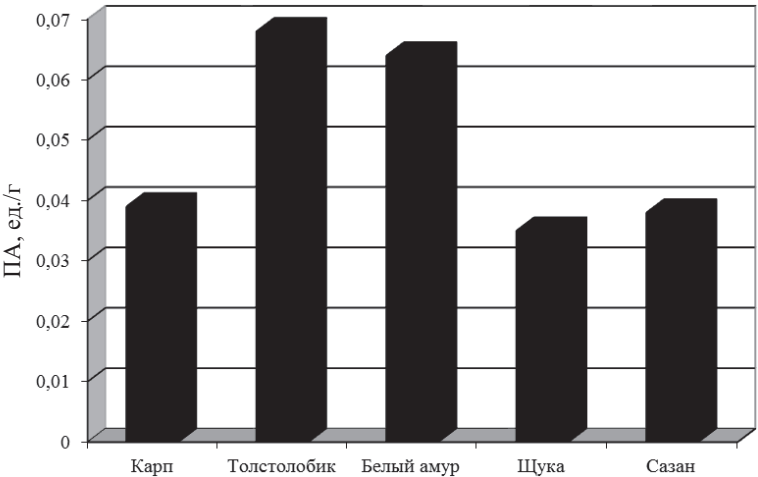
Таблица 1
Константы автопротеолиза мышечной ткани и внутренних органов прудовых рыб
Table 1
Constants for autoprteolysis of muscle tissue and viscera of pond fish

Вид рыб	Константа автопротеолиза, (мг/100 г)/ч	
	мышечной ткани	внутренних органов
Карп <i>Cyprinus carpio</i>	84,80	213,56
Толстолобик (<i>Hypophthalmichthys</i>)	112,40	258,15
Белый амур <i>Ctenopharyngodon idella</i>	72,26	189,50
Щука <i>Esox lucius</i>	79,10	160,40
Сазан <i>Cyprinus carpio</i>	84,50	187,90

На рис. 1 представлена ПА катепсинов мышечной ткани прудовых рыб.

Рис. 1. Протеолитическая активность катепсинов мышечной ткани прудовых рыб при pH 6,0–6,5

Fig. 1. Proteolytic activity for cathepsins from muscle tissue of pond fish under pH = 6.0–6.5



Как видно на рис. 1, ПА катепсинов мышечной ткани карпа, толстолобика, белого амура, щуки и сазана при pH мышечного сока 6,0–6,5 имеет низкие значения — 0,038–0,068 ед./г.

Однако состав комплексов протеолитических ферментов на сегодняшний день изучен не полностью, лишь некоторые ферменты рыбного сырья выделены в кристаллическом состоянии, а их индивидуальные свойства изучены (Elert, 2004; Дворянинова, 2014).

На рис. 2–5 представлены результаты анализа активности катепсинов мышечной ткани рыб внутренних водоемов в зависимости от продолжительности хранения при различных pH среды. Катепсины мышечной ткани большинства прудовых рыб проявляют максимальную активность при pH 4,5–5,0.

Ход кривых, показанных на рис. 2–5, свидетельствует о том, что закономерности изменения активности ферментов в процессе хранения рыб имеют аналогичную зависимость и по характеру совпадают с известными данными (Антипова и др., 2012). Максимум накопления ПА для всех исследуемых объектов наблюдался после 24 ч хранения при pH 5.

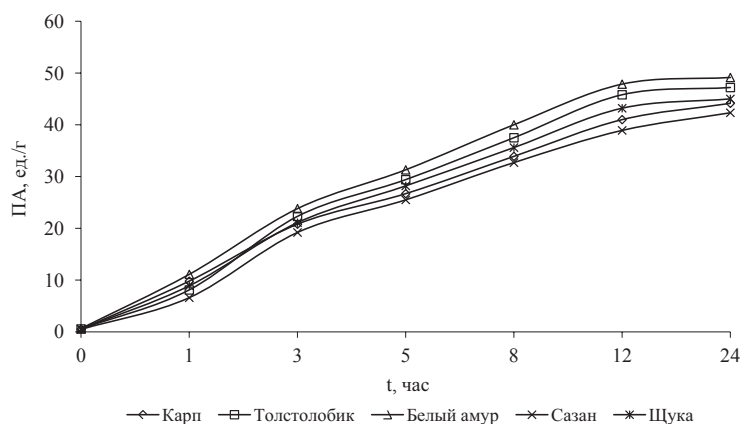


Рис. 2. Протеолитическая активность катепсинов мышечной ткани рыб при pH = 3

Fig. 2. Proteolytic activity for cathepsins from muscle tissue of pond fish under pH = 3

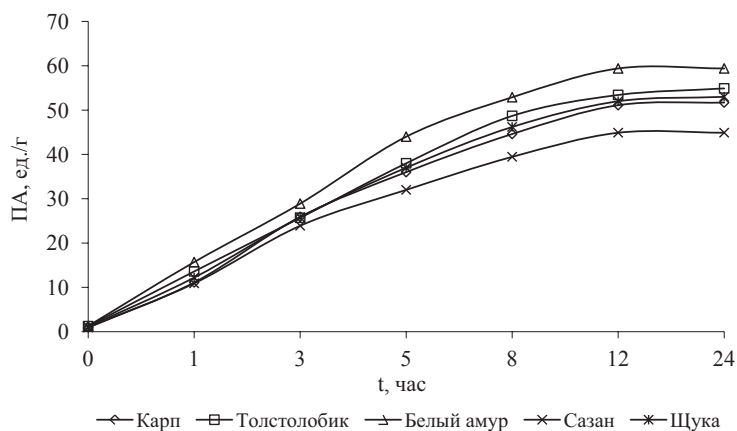


Рис. 3. Протеолитическая активность катепсинов мышечной ткани рыб при pH = 4

Fig. 3. Proteolytic activity for cathepsins from muscle tissue of pond fish under pH = 4

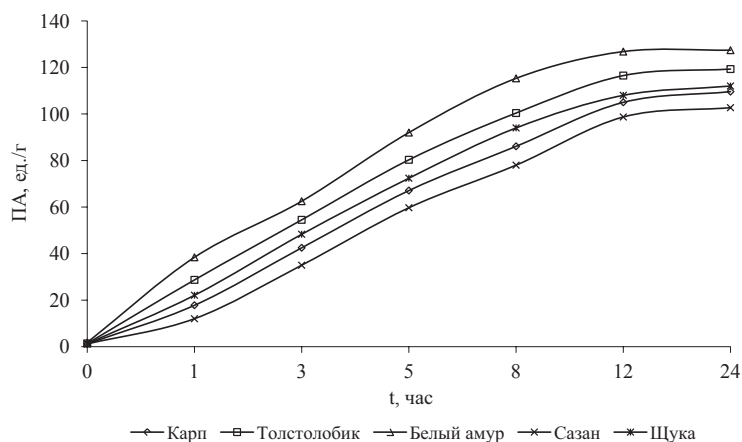


Рис. 4. Протеолитическая активность катепсинов мышечной ткани рыб при pH = 5

Fig. 4. Proteolytic activity for cathepsins from muscle tissue of pond fish under pH = 5

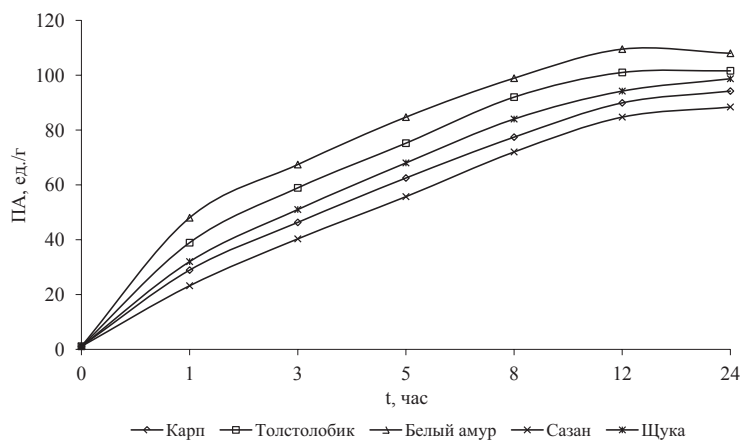


Рис. 5. Протеолитическая активность катепсинов мышечной ткани рыб при pH = 6

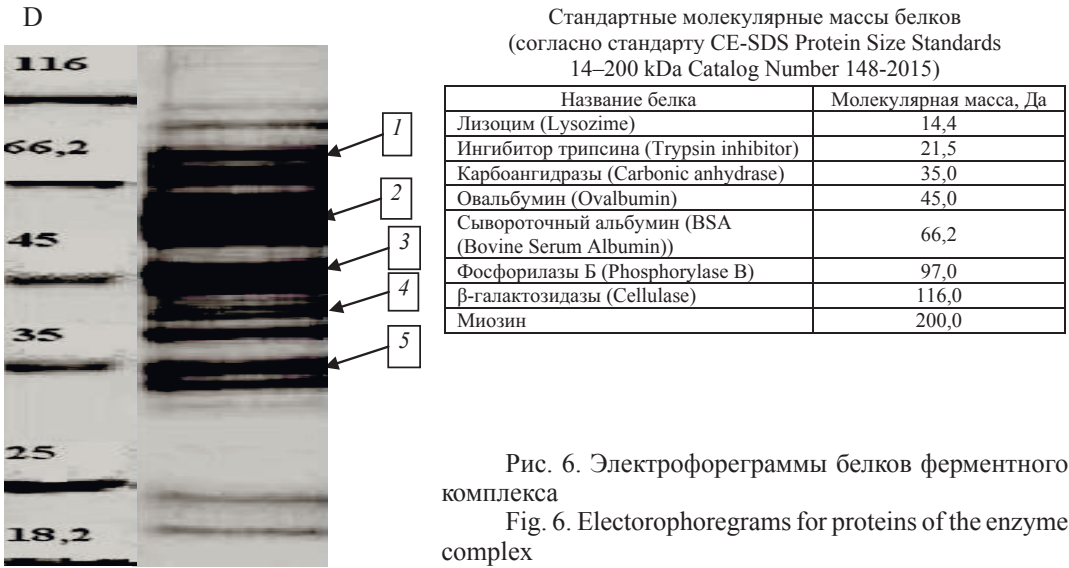
Fig. 5. Proteolytic activity for cathepsins from muscle tissue of pond fish under pH = 6

Для белого амура ПА = 124,58 ед./г, для карпа — 118,99, толстолобика — 120,32, сазана — 117,93 и щуки — 112,10 ед./г.

Заметим, что в настоящее время в литературе (см. Антипова и др., 2016) отсутствует информация о свойствах лизосомальных ферментов прудовых рыб, знания о которых позволят управлять автолитическими превращениями, а следовательно, качеством рыбопродуктов.

Исследование свойств катепсинов прудовых рыб проводили на примере ферментного комплекса, выделенного из мышечной ткани карпа.

На электрофореграммах белков (рис. 6) ферментного комплекса идентифицировано 5 основных фракций, молекулярная масса которых находилась в интервале от 35 до 116 Да, одна из которых (2) количественно преобладала над остальными и лежала в пределах 45,0–66,2 Да, что согласно стандарту «CE-SDS Protein Size Standards 14–200 kDa Catalog Number 148-2015» весьма близко к кислым и нейтральным протеиназам, т.е. катепсинам (Дворянинова, Антипова, 2012).



Наличие дополнительных полос в спектре комплекса можно объяснить двумя причинами. Во-первых, ферментный комплекс часто представляет собой гетерогенную систему, сочетает в своем составе несколько компонентов, обладающих различным спектром активности. Во-вторых, в процессе хранения возможно образование различных минорных компонентов, дополняющих спектр препарата.

Отметим, что при выделении комплекса катепсинов и освобождении от балластных веществ, в том числе белков, на каждой стадии очистки наблюдали повышение удельной активности ферментного комплекса (на грамм белка), при этом степень очистки на последней стадии составила 21.

Параметр Rf (электрофоретическая подвижность), характеризующий подвижность полипептидов в геле, определяли как частное расстояний, пройденных анализируемыми полипептидами и фронтом (рис. 7) (Antipova et al., 2012).

Результаты исследования протеолитической активности ферментного комплекса приведены на рис. 8.

Влияние концентрации водородных ионов на каталитическую активность ферментного комплекса катепсинов состоит в воздействии ее на активный центр. При разных значениях pH в реакционной среде активный центр может быть слабее или сильнее ионизирован, больше или меньше экранирован соседними с ним фрагментами полипептидной цепи белковой части фермента и т.п. Кроме того, pH среды влияет на степень ионизации субстрата, фермент-субстратного комплекса и продуктов реакции, оказывает большое влияние на состояние фермента, определяя соотношение в нем катионных и анионных центров, что сказывается на третичной структуре белковой

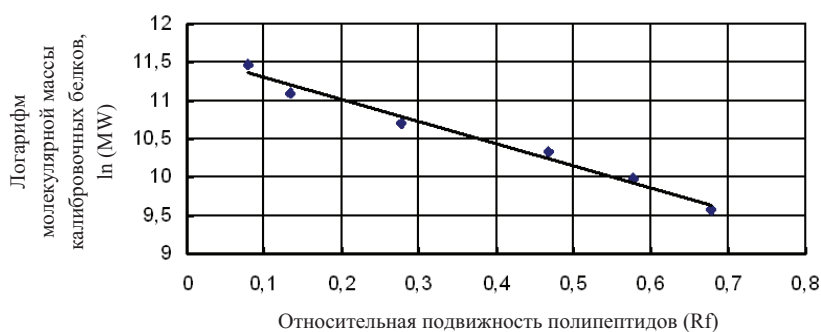


Рис. 7. Калибровочная кривая для определения молекулярной массы опытного образца в полиакриламидном геле

Fig. 7. Calibration curve for molecular weight of a test sample in polyacrylamide gel

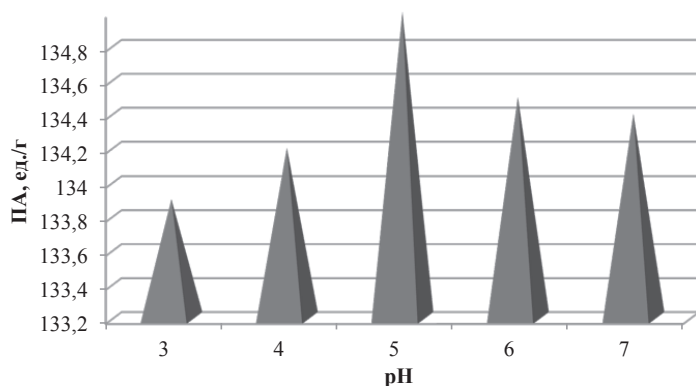


Рис. 8. Протеолитическая активность ферментного комплекса катепсинов из мышечной ткани карпа

Fig. 8. Proteolytic activity of cathepsins from muscle tissue of carp

молекулы. Последнее обстоятельство заслуживает особого внимания, так как определенная третичная структура белка-фермента необходима для образования фермент-субстратного комплекса (Lopes, 2003; Lange, 2008; Antipova et al., 2011).

Исследование влияния концентрации водородных ионов на ПА ферментного комплекса проводили в интервале от 3 до 7. Рабочей областью pH для исследуемого ферментного комплекса является диапазон от 4,5 до 6,5. Как видно на рис. 8, максимальную ПА (134 ед./г) ферментный комплекс имеет при pH 5.

Так как эффективность ферментных процессов тесно связана с физико-химической характеристикой ферментов (Рыбоводство..., 2009) и прежде всего с оценкой условий их активности и стабильности, наши предположения были доказаны исследованием влияния температуры и pH на ферментативную активность катепсинов рыб, проведенным на субстратах водорастворимых и солерастворимых белков (рис. 9, 10).



Рис. 9. Влияние температуры на протеолитическую активность катепсинов на разных субстратах

Fig. 9. Effect of temperature on proteolytic activity of cathepsins on certain substrata in vitro



Рис. 10. Влияние концентрации водородных ионов на протеолитическую активность ферментного комплекса

Fig. 10. Effect of hydrogen ion concentration on proteolytic activity of the enzyme complex

На рис. 9 видно, что экстремальные кривые имеют колоколообразную форму с четко выраженным максимумом. Это объясняется высокой скоростью термоинактивации ферментного комплекса катепсинов, которая носит лавинообразный характер (Дворянинова и др., 2010). Установили, что максимальная активность комплекса катепсинов находилась в интервале температур от 40 до 75 °С. При температуре более 75 °С фермент инактивируется полностью.

Исследование влияния pH на активность ферментного комплекса проводили в диапазоне от 2 до 11 на различных субстратах при оптимальной температуре. Установлено, что рабочей областью pH для выделенного из мышечной ткани карпа ферментного комплекса следует считать интервал от 5,0 до 7,5 (рис. 10), что совпадает с pH тузлука при традиционном посоле рыбы.

На рис. 11 видно, что исследуемый ферментный комплекс при температурном режиме 4 °С (температура при посоле) имеет стабильность не менее 83 % (для водорастворимой фракции ПА = 116,6 ед./г, для солерастворимой ПА = 112,5 ед./г) от первоначальной активности (ПА = 134,0 ед./г).

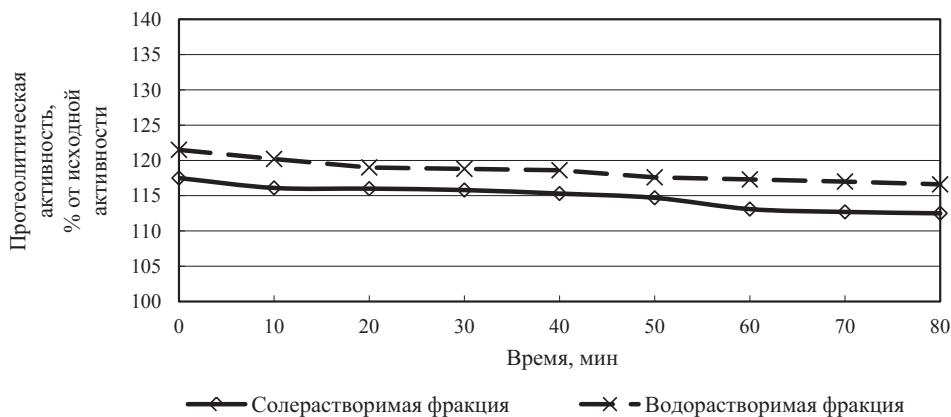


Рис. 11. Термостабильность ферментного комплекса катепсинов из мышечной ткани карпа при температуре 4 °С

Fig. 11. Thermal stability of cathepsins from muscle tissue of carp under temperature of 4 °С

При температуре выше 100 °С ферментный комплекс полностью инактивируется (рис. 12), что является следствием изменения конформационного состояния молекулы (Дворянинова и др., 2010).

На следующем этапе ферментные препараты получали из внутренностей прудовых рыб по технологической схеме, разработанной в Астраханском государственном техническом университете (Мукатова и др., 2006). Ферментные препараты были получены размораживанием внутренностей исследуемых видов прудовых рыб, их измельчением, смешиванием с 50 % воды (к массе измельченных внутренностей),

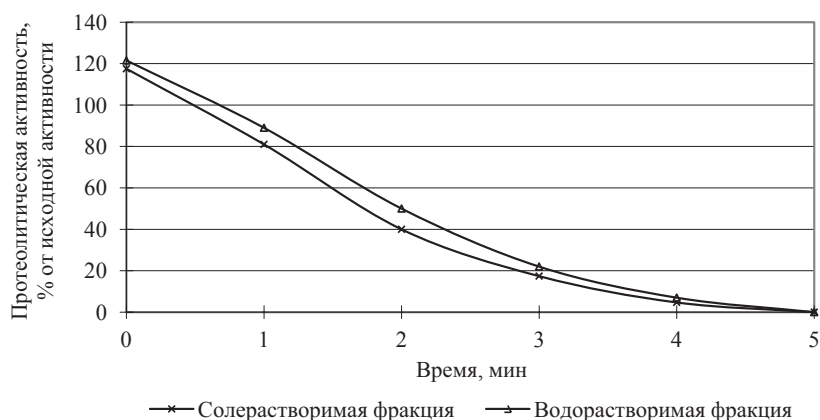


Рис. 12. Термостабильность ферментного комплекса катепсинов из мышечной ткани карпа при температуре 100 °С
 Fig. 12. Thermal stability of cathepsins from muscle tissue of carp under temperature of 100 °C

подкислением смеси соляной кислотой до pH 1,5–2,5, ферментацией при температуре 38–40 °С в течение 4–5 ч и центрифугированием с частотой вращения ротора 3 000 об/мин в течение 20 мин. Полученные ферментные препараты были названы комплексом кислых протеиназ (Грачева, 2000). Выход полученных жидких препаратов достигал 41–56 % к исходной массе используемого сырья в зависимости от степени его свежести и количества жировых отложений во внутренних органах указанных видов рыб. Протеолитическая активность внутренностей и полученных из них ферментных препаратов приведена в табл. 2.

Таблица 2
 Сравнительная характеристика ПА внутренностей и ферментных препаратов
 Table 2
 Comparative characteristics of proteolytic activity for viscera and enzyme preparations

Вид	ПА, ед./г		ПА полученных препаратов по отношению к ПА внутренностей, %
	внутренностей	ферментного препарата из внутренностей	
Карп	2,50	2,45	98,0
Толстолобик	2,80	2,79	99,6
Белый амур	2,42	2,39	98,7
Щука	2,10	2,05	97,6
Сазан	2,30	2,24	97,4

Анализ данных табл. 2 показывает, что ПА внутренностей прудовых рыб значительно выше, чем их мышечной ткани (см. рис. 1). Активность ферментных препаратов из внутренностей в процессе выделения снижается незначительно. Фактический выход ферментных препаратов из внутренностей рыб составляет 97,4–99,6 %, причем максимум отмечен у толстолобика (99,6 %). Судя по данным литературы (Дворянинова и др., 2015), ферментные препараты, имеющие активность 2,05–2,79 ед./г, могут быть использованы для ускорения процессов созревания продукции из их мышечной ткани.

Закключение

Таким образом, ввиду выраженной активности весьма перспективным направлением становится получение и использование ферментных комплексов в технологии рыбных продуктов, например соленых, для сокращения времени созревания и улучшения органолептических показателей продукта. Особенно это относится к ферментным препаратам, полученным из внутренних органов рыб.

Список литературы

- Антипова Л.В., Дворянинова О.П., Соколов А.В.** Прудовые рыбы в улучшении структуры питания населения: гигиенические аспекты // Гигиена и санитария. — 2016. — Т. 95, № 1. — С. 84–90.
- Антипова Л.В., Дворянинова О.П., Черкесов А.З.** Биохимический механизм автолитических процессов мышечной ткани рыб // Вестн. ВГУИТ. — 2015. — № 2. — С. 92–97.
- Антипова Л.В., Дворянинова О.П., Чудинова Л.П.** Прудовые рыбы: биотехнологический потенциал и основы рационального использования ресурсов : моногр. — Воронеж : ВГУИТ, 2012. — 404 с.
- Грачева И.М.** Технология ферментных препаратов : учеб. пособие. — М. : Элевар, 2000. — 512 с.
- Дворянинова О.П.** Получение и исследование свойств катепсинов мышечной ткани прудовых рыб // Технологии пищевой и перерабатывающей промышленности АПК — продукты здорового питания. — 2014. — № 4. — С. 14–27.
- Дворянинова О.П., Алехина А.В., Сторублевцев С.А.** Получение и исследование свойств ферментного комплекса мяса пресноводного карпа // Изв. вузов. Пищ. технология. — 2010. — № 4. — С. 13–15.
- Дворянинова О.П., Антипова Л.В.** Аквакультурные биоресурсы: научные основы и инновационные решения : моногр. — Воронеж : ВГУИТ, 2012. — 420 с.
- Дворянинова О.П., Соколов А.В., Черкесов А.З.** Сырьевая база водных биоресурсов как важнейший фактор обеспечения продовольственной безопасности страны // Технологии пищевой и перерабатывающей промышленности АПК — продукты здорового питания. — 2015. — № 2. — С. 22–29.
- Мукатова М.Д., Киричко Н.А., Утеушев Р.Р.** Ферменты. Способы получения ферментов и методы определения их активности : метод. указания к лаб. практикуму. — Астрахань : АГТУ, 2006. — 62 с.
- Николаенко О.А.** Методы исследования рыбы и рыбных продуктов : учеб. пособие. — СПб. : ГИОРД, 2011. — 176 с.
- Рыбоводство. Основы разведения, вылова и переработки рыб в искусственных водоемах :** учеб. пособие / Л.В. Антипова, О.П. Дворянинова, О.А. Василенко и др. — СПб. : ГИОРД, 2009. — 472 с.
- Antipova L.V., Dvoryaninova O.P., Alyohina A.V. et al.** Leather-Processing Semimanufactures Biotechnology out of the Freshwater Fish Skin // Biotechnology and the Ecology of Big Cities. Biotechnology in Agriculture, Industry and Medicine. — N.Y. : Nova Science Publishers, Inc., 2011. — P. 151–158.
- Antipova L.V., Dvoryaninova O.P., Daniliv M.M., Skripinsky R.O.** Receiving fish proteinaceous hydrolyzates of food appointment // Food science, engineering and technologies (Scientific works of UFT, Vol. 59). — Bulgaria, Plovdiv, 2012. — P. 979–984.
- Elert E.** Protease activity in gut of *Daphnia magna*: evidence for trypsin and chymotrypsin enzymes // Comp. Biochem. Physiol. — 2004. — Vol. 137 B. — P. 287–296.
- Lange U.** Conducting polymers in chemical sensors and arrays // Analytica Chimica Acta. — 2008. — Vol. 614. — P. 1–26.
- Lopes A.R.** Purification, properties and substrate specificity of a digestive trypsin from *Periplaneta americana* // Insect Biochem. Biol. — 2003. — Vol. 33. — P. 407–415.

Поступила в редакцию 12.09.16 г.