

УДК 606:664.952/957



Торможение ферментативного гидролиза белковых веществ в субстратах из черноморской атерины

А. ВИННОВ, канд. техн. наук
Национальный университет биоресурсов
и природопользования Украины

Аннотация. Представлена оценка диффузионного торможения ферментативного гидролиза белков вязких субстратов препаратом протосубтилин Г3Х. Приведен химический состав субстратов на основе мышечной ткани черноморской атерины. Построены кривые ферментализации, для которых наблюдается диффузионное торможение. Получены значения теоретической и практических кажущихся констант Михаэлиса.

Ключевые слова: ферментативный гидролиз, диффузионное торможение, протосубтилин Г3Х, констант Михаэлиса.

Assessment of proteins enzymatic hydrolysis diffusion inhibition in the substrates on the basis of the Black Sea atherine. ALEKSEY S. VINNOV (National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine).

Abstract. It is presented the estimation of enzymatic hydrolysis diffusion inhibition of viscous protein substrates by the enzyme drug Protosubtilin G3X. The chemical composition of the substrates on the Black Sea atherine muscle tissues basis is presented. It is shown hydrolysis curves for which diffusion inhibition is observed.

Keywords: enzymatic hydrolysis, diffusion inhibition, Protosubtilin G3X, Michaelis constants.

Оцінка дифузійного гальмування процесу ферментативного гідролізу білкових речовин в субстратах на основі чорноморської атерини. Олексій О. ВИННОВ (Національний університет біоресурсів і природокористування України)

Анотація . Представлена оцінка дифузійного гальмування ферментативного гідролізу білків в'язких субстратів ферментним препаратом протосубтилін Г3Х. Наведено хімічний склад субстратів на основі м'язової тканини чорноморської атерини. Побудовані криві ферментолізу, для яких спостерігається дифузійне гальмування. Отримано значення теоретичної і практичних констант Міхаеліса.

Ключові слова: ферментативний гідроліз, дифузійне гальмування, протосубтилин Г3х, констант Міхаеліса.

Белковые гидролизаты находят широкое применение в пищевой промышленности, фармакологии, животноводстве, ветеринарии, производстве косметических средств и других отраслях хозяйственной деятельности. Производство этих продуктов позволяет значительно повысить экономическую эффективность пищевых предприятий, т.к. в их технологии может быть использовано практически любое белковое сырье, в

том числе отходы от переработки рыбы и мяса, малотоварная мелкая рыба, различные растительные жмыхи и шроты.

Основной процесс технологии белковых гидролизатов – гидролитическая деградация высокомолекулярных белков сырья, может быть осуществлен под каталитическим действием кислот, щелочей или протеолитических ферментов. Применение ферментативного гидролиза является более предпочтительным, т.к. позволяет избежать использования больших количеств кислот или щелочей, разрушения и изомеризации ряда аминокислот, не

Рецензенты:
кандидаты техн. наук **Г.М. Бандуренко** (НУПТ, Киев);
Т.А. Маноли (ОНАПТ, г.Одесса)

Таблица 1.

Химический состав экспериментальных субстратов на основе мышечной ткани атерины черноморской.

| Показатель | Субстрат с естественным содержанием влаги | Субстрат с гидромодулем 0,25 |
|--|---|------------------------------|
| Массовая доля воды, % | 78,60 | 82,86 |
| Общий азот (ОА), мг/100 г | 2570,80 | 2060,50 |
| Небелковый азот (НБА), мг/100 г | 205,60 | 158,40 |
| Белковый азот (БА = ОА-НБА), мг/100 г | 2365,20 | 1892,10 |
| Массовая доля жира, % | 2,81 | 2,25 |
| Массовая доля минеральных веществ, мг/100г | 2,53 | 2,02 |

требует нейтрализации с последующим обессоливанием продукта.

Ферментативные белковые гидролизаты, представляющие собой аминокислотно пептидные смеси, физиологичны, легко усваиваются при разных способах введения. Они нетоксичны, неантигенны, не дают анафилактических реакций и других побочных эффектов, содержат биологически активные вещества негормональной природы [1]. В промышленных условиях при производстве рыбных белковых ферментативных гидролизатов, субстратные системы естественной влажности представляют собой вязкие смеси, состоящие из растворенных, диспергированных и эмульгированных фрагментов сырья. Ферментативный гидролиз таких субстратов является диффузионно контролируемым процессом. Его скорость в значительной мере зависит от эффективности массопереноса фермента и субстрата и тем ниже, чем больше вязкость системы [2,3].

В то же время, несмотря на диффузионное торможение процесса, ферментативный гидролиз вязких рыбных субстратов естественной влажности представляет значительный практический интерес, т.к. позволяет снизить его энергоемкость, исключив высушивание или выпаривание влаги, обычно вводимой в фермент-субстратную систему. В этой связи, оценка степени диффузионного торможения процесса ферментативного гидролиза в вязких фермент-субстратных системах представ-



ляет собой важную практическую и теоретическую задачу.

Решение этой проблемы представляется возможным в результате применения методов кинетического анализа кривых ферментативного гидролиза субстратных систем различной вязкости с использованием интегральной формы уравнения Михаэлиса – Ментен и его линейных анаморфоз [4], в частности в координатах Вокера – Шмидта, а также с помощью метода Фостера – Ниемана, правила Лопиталья.

Названные теоретические способы обоснования оценки влияния диффузионного торможения процесса ферментативного гидролиза белковых веществ промышленных субстратов требуют экспериментальной проверки.

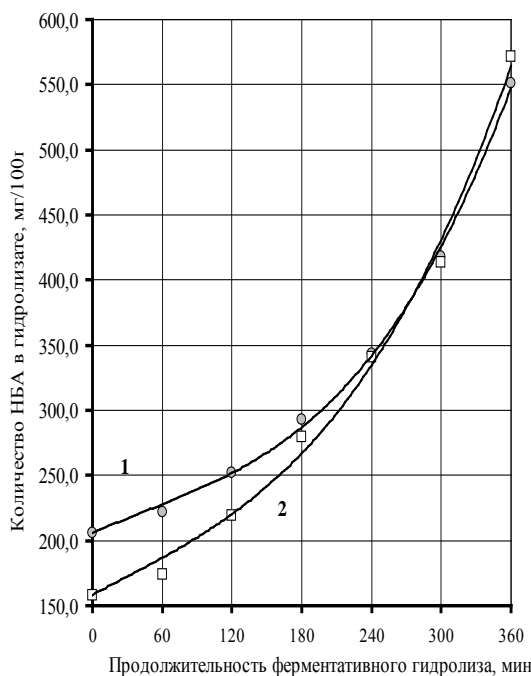


Рис. 1. Накопление продуктов ферментативного гидролиза белков фермент-субстратных систем с различной влажностью

- 1- фермент – субстратная система с гидромодулем - 0;
- 2- фермент – субстратная система с гидромодулем - 0,25.

В этой связи, цель настоящей работы состояла в экспериментальной оценке степени диффузионного торможения ферментативного гидролиза белковых веществ вязких субстратных систем.

В качестве основных видов сырья и материалов в опытах использовали атерину черноморскую (*Atherina mochon pontica*) и ферментный препарат микробиологического происхождения - протосубтилин ГЗХ.

Для снижения влияния автолитических процессов рыбное сырье обезглавливали и удаляли внутренние органы. При формировании субстратных систем подготовленное сырье измельчали на волчке с диаметром отверстий зеерной решетки 3 мм. В эксперименте использовали вязкие рыбные основы естественной влажности и субстраты с добавлением 25% дистиллированной воды. Полученные образцы перемешивали, разогревали до 50°C и блендировали при 1000 об/мин, в течение 1 минуты с одновременным введением в систему сухого ферментного препарата в количестве 10 мг/г белка. Одновременно, для подавления гнилостных процессов в систему в качестве консерванта вводили 0,5% пиросульфита натрия ($Na_2S_2O_5$).

Полученные фермент-субстратные системы на-



правляли на инкубирование при температуре 50°C. Гидролиз проводили в течение 360 минут в водяном ультратермостате при естественных значениях pH.

Протекание процесса ферментализации оценивали по накоплению небелковых азотистых веществ (НБА) в гидролизате после осаждения высокомолекулярных белков трихлоруксусной кислотой и фильтрации. Количество НБА определяли по методу Кьельдаля (анализатор VЕLP Scientifica).

Для получения необходимых в расчетах данных и полной характеристики созданных субстратов в них определяли массовую долю воды, содержание общего и небелкового азота, массовой доли жира, экстрагируемого этиловым эфиром, общее количество минеральных веществ.

Результаты, полученные в ходе исследований химического состава сформированных рыбных субстратов, (табл. 1) позволяют считать, что данные системы способны обеспечить необходимые условия эксперимента. Низкое количество НБА - 7,7-9% от содержания общего азота обеспечивает конкурентное торможение ферментативного гидролиза высокомолекулярных белковых веществ пептидами не оказывая значительного влияния на протекание процесса.

Экспериментальные зависимости, описывающие динамику накопления продуктов гидролиза высокомолекулярных белков фермент-субстратных систем с естественным содержанием влаги и гидромодулем 0,25 представлен на рис. 1.

Из их характера видно, что в течение 360 минут процесс ферментативного гидролиза белковых веществ рассматриваемых субстратов не достигает этапа затухания по принятому индикаторному показателю (НБА).

Для полученных кривых можно выделить три интервала с разной скоростью процесса. На первом, практически прямолинейном участке, при продол-

Таблица 2.

**Коэффициенты линеаризованных экспериментальных,
вспомогательных и теоретических прямых.**

| Характеристика прямых | Уравнение описывающее полученные прямые в координатах Вокера – Шмидта | Значение кажущейся константы Михаэлиса |
|--|---|--|
| Линеаризованная в координатах Вокера – Шмидта экспериментальная зависимость для фермент – субстратной системы с гидромодулем равным 0; | $0,0352 - \frac{2126,9}{r} \ln \frac{\sum[S]_t}{\sum[S]_t - \sum[P]}$ | 2126,90 |
| Линеаризованная в координатах Вокера – Шмидта экспериментальная зависимость для фермент – субстратной системы с гидромодулем равным 0,25; | $0,0537 - \frac{1636,4}{r} \ln \frac{\sum[S]_t}{\sum[S]_t - \sum[P]}$ | 1636,40 |
| Вспомогательная прямая, проведенная из начала координат для фермент – субстратной системы с гидромодулем равным 0; | $\frac{2165,2}{r} \ln \frac{\sum[S]_t}{\sum[S]_t - \sum[P]}$ | $\text{tg } \alpha_1 = \sum[S]_{01}$ |
| Вспомогательная прямая, проведенная из начала координат для фермент – субстратной системы с гидромодулем равным 0,25; | $\frac{1892,1}{r} \ln \frac{\sum[S]_t}{\sum[S]_t - \sum[P]}$ | $\text{tg } \alpha_2 = \sum[S]_{02}$ |
| Теоретическая прямая характеризующая процесс гидролиза белков принятых субстратов в координатах Вокера – Шмидта при отсутствии торможения. | $0,2356 - \frac{770,36}{r} \ln \frac{\sum[S]_t}{\sum[S]_t - \sum[P]}$ | 770,36 |
| Координаты точек пересечения линеаризованных экспериментальных и вспомогательных прямых: | | |
| для фермент – субстратной системы с гидромодулем равным 0 | (0,000148; 0,349) | |
| для фермент – субстратной системы с гидромодулем равным 0,25 | (0,000210; 0,397) | |
| <p>$\sum[S]_{01}$ – концентрация высокомолекулярных белков в фермент – субстратной системы с гидромодулем равным 0;</p> <p>$\sum[S]_{02}$ – концентрация высокомолекулярных белков в фермент – субстратной системы с гидромодулем равным 0,25.</p> | | |

жительности гидролиза в пределах 160-180 минут его скорость минимальна. На втором криволинейном участке (160-240 минут), наблюдается активация гидролиза со значительным увеличением скорости каталитической деградации белков субстратов. Третий этап ферментализации протекает с постоянной максимальной скоростью.

Учитывая небольшое количество небелковых азотистых веществ в исходных субстратах, наиболее правдоподобным объяснением низкой скорости процесса на первом участке может быть его диффузионное торможение, которое снижается по мере развития протеолиза.

Для оценки степени диффузионного торможения процесса необходимо линеаризовать экспериментальные зависимости в координатах Вокера-Шмидта с построением вспомогательных прямых, характеризующих процесс в начальной точке процесса при $t \rightarrow 0$ для каждого вида субстрата. Тангенс угла наклона теоретической линии, проведенной через точки пересечения линеаризованных экспериментальных и вспомогательных прямых будет численно равен кажущейся константе Михаэлиса ($K''m$) при отсутствии, какого-либо торможения.

Реализация указанных графических преобразований приведена на рис. 2.

Количественные характеристики линеаризованных экспериментальных, вспомогательных и теоретических прямых, координаты точек пересечения представлены в табл. 2.

Полученные значения кажущейся константы Михаэлиса для экспериментальных и теоретических зависимостей, описывающих ферментативный гидролиз высокомолекулярных белков принятых в исследованиях субстратов, свидетельствуют о значительном влиянии диффузионного торможения на скорость этого процесса.

Для систем естественной влажности диффузионное торможение снижает сродство ферментов и белковых субстратов в 2,76, а для систем с гидро-модулем 0,25 в 2,12 раза.

Из представленных результатов становится очевидным необходимость разработки методов преодоления эффекта диффузионного торможения

процесса ферментативного гидролиза белков вязких субстратов, которыми являются практически все промышленные белковые субстраты.

Выводы.

1. Экспериментальные субстратные системы на основе мышечной ткани черноморской атерины (*Atherina moschon pontica*) содержат небольшое количество низкомолекулярных соединений белковой природы, что позволяет не учитывать возможные эффекты конкурентного торможения ферментализации на начальных этапах процесса.

2. На начальной стадии гидролиза наблюдается интенсивное диффузионное торможение процесса. Его диффузионную природу подтверждает дальнейшее увеличение скорости ферментализации.

3. Из сравнения значений кажущихся констант Михаэлиса для субстратов различной влажности на основе мышечной ткани черноморской атерины следует, что в системе с повышенной влажностью сродство комплекса ферментов препарата протосубтилин ГЗХ к белкам субстрата выше, чем в системах естественной влажности.

4. Отмечено значительное диффузионное торможение в 2,76-2,12 ферментативного гидролиза белковых веществ рыбных субстратов естественной влажности.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Телишевская Л.Я.** Белковые гидролизаты: получение, состав, применение. /Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук.– М.: РГБ ОД, 2000.– 296 с.
2. **Румянцева Г.Н.** Научные и практические аспекты использования ферментативного катализа в пищевой промышленности.– М.: МГУПБ, 2007.– 101 с.
3. **Виннов А.** Интенсивность гидролиза белков черноморского шпрота ферментным препаратом протосубтилин ГЗХ.// Продовольча індустрія АПК.– 2013.– №4.– С. 36–40.
4. **Корниш-Бодуэн Э.** Основы ферментативной кинетики.– М.: «Мир», 1979.– 272 с.

