

УДК 574.5:577.1:[664.951.014:577.112]

Электрохимический способ получения ферментативных белковых гидролизатов из гидробионтов, используемых для приготовления микробиологических питательных сред

Ю.А. Кучина¹, Е.В. Шошина², С.Ю. Дубровин¹, Н.М. Путинцев³,
И.Н. Коновалова³, П.Б. Василевский⁴

¹ Технологический факультет МГТУ, кафедра технологии пищевых производств

² Биологический факультет МГТУ, кафедра биологии

³ Технологический факультет МГТУ, кафедра химии

⁴ Естественно-технический факультет МГТУ, кафедра экологии и защиты окружающей среды

Аннотация. Показана возможность использования ферментативных белковых гидролизатов, полученных электрохимическим способом из гидробионтов, в качестве основы микробиологических питательных сред. Питательные среды на основе данного гидролизата имеют хорошую чувствительность к росту и типичную морфологию колоний тест-культур: *Corynebacterium xerosis* 1911, *Staphylococcus aureus* Wood – 46, *Escherichia coli* 055 K59 3912/41, *Pseudomonas aeruginosa* 27/99, *Shigella flexneri* la 8516 и *Salmonella typhi* H – 901.

Abstract. The possibility of using the enzymatic protein hydrolysates' obtained by the electrochemical method out of hydrobionts as a basis of microbiological nutrient media has been shown in the paper. The nutrient media based on this hydrolysate have sufficient sensitivity to growth and the typical morphology of test-culture colonies: *Corynebacterium xerosis* 1911, *Staphylococcus aureus* Wood – 46, *Escherichia coli* 055 K59 3912/41, *Pseudomonas aeruginosa* 27/99, *Shigella flexneri* la 8516 and *Salmonella typhi* H – 901.

1. Введение

В конце XX в. в связи с дефицитом пищевого белка животного происхождения для производства белковых гидролизатов для микробиологических целей стали использовать сырье водного происхождения. В настоящее время около 30 % наименований сухих питательных микробиологических сред содержат в своем составе панкреатический гидролизат рыбы или рыбной муки (Телишевская, 2000; Неклюдов и др., 2000; Артюхин и др., 1990). Для получения белковых гидролизатов используют два способа расщепления белка: кислотный (химический) и ферментативный. Аминокислотный состав белковых гидролизатов, полученных с помощью химического или ферментативного гидролиза, достаточно хорошо изучен (Телишевская, 2000; Мухин, Новиков, 2001). В литературе также рассмотрены способы получения белкового гидролизата с помощью электрохимической технологии (Маслова и др., 1991; Куприна и др., 2003; Няникова и др., 2003). Так, в авторском свидетельстве Г.В. Масловой описывается способ получения щелочного белкового гидролизата, в котором необходимую величину $pH > 7$ создавали электролизом водных растворов неорганических солей. Технологическая схема процесса электрохимического гидролиза, предложенная Масловой, состоит из следующих стадий: измельчение сырья, экстракция и гидролиз белка, нейтрализация раствора, отделение нерастворившегося осадка (Маслова и др., 1991). Экстракцию белка и нейтрализацию полученного раствора проводили в диафрагменном электролизере, в котором условия щелочного гидролиза обеспечивались за счет пропускания постоянного электрического тока в низко концентрированном растворе электролита ($NaCl$, Na_2SO_4) в катодной камере электролизера. Нейтрализацию раствора проводили в анодной камере электролизера до значений pH 5.8-8.5. Белковый гидролизат, полученный по данной технологии, содержал 1.2-1.8 % аминного азота, 10-15 % общего азота, 54-65 % белка, 20-28 % хлорида натрия. Однако аминокислотный состав полученных по этой технологии гидролизатов практически не изучен.

Целью работы являлось изучение процесса ферментативного гидролиза белоксодержащего сырья с помощью электролиза водного раствора $NaCl$, исследование химического и аминокислотного состава полученных гидролизатов и изучение возможности их использования в микробиологии.

Разработанный нами способ гидролиза белоксодержащего сырья заключается в использовании ферментных препаратов и процесса электролиза водных растворов неорганических солей. При

электролизе обеспечиваются необходимые значения величины рН и температуры для проведения процесса ферментативного гидролиза белоксодержащего сырья. Таким образом, создаются условия ферментации без использования агрессивных химических реагентов – кислот и щелочей, а нагрев реакционной среды осуществляется за счет выделения омического тепла при прохождении электрического тока через раствор электролита.

2. Объекты и методы анализа

В качестве белоксодержащего сырья использовали рыбную муку (ГОСТ2116-82) и мороженую рыбу (путассу) с низкой товарной ценностью.

Для расщепления белоксодержащего сырья применяли ферментный препарат панкреатин с активностью 8*USP – 200 ед. (производства США).

Аминокислотный состав полученных белковых гидролизатов сравнивали с коммерческим панкреатическим гидролизатом рыбы производства ОАО "Протеин" (г. Мурманск) и панкреатическим гидролизатом рыбной муки производства НПО "Питательные среды" (г. Оболенск) (Артюхин и др., 1990; Телишевская, 2000; Мухин, Новиков, 2001).

Ферментативная электрохимическая технология состоит из следующих операций: измельчение сырья, смешение с раствором электролита, электроэнзиматический гидролиз в электролизере при заданной температуре и рН реакционной среды, термоинактивация фермента, отстаивание, декантация, отделение негидролизованного сырья и веществ липидной природы с помощью фильтрации и сушка.

Гидролиз сырья проводили в электролизере с инертными электродами при постоянном перемешивании и плотности тока 300-400 А/м².

Для фильтрации использовали фильтровальную ткань-белтинг и бумажные фильтры "белая лента".

Величину рН растворов определяли с помощью универсального иономера ЭВ-74.

Эффективность процесса ферментации белоксодержащего сырья определяли по степени гидролиза (отношение аминного азота к общему азоту – $N_{ам}/N_{об}$, %) и по изменению в процессе гидролиза содержания аминного азота в реакционной среде.

Химический состав полученных гидролизатов изучали согласно ГОСТу 7636-85.

Аминокислотный анализ полученных гидролизатов проводили методом обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием системы ВЭЖХ LC-10A_{VP} ("Shimadzu Corp.", Япония) и колонки SupelcosilTM LC-18 ("SUPELCO", США). Для регистрации продуктов, содержащих свободные аминокислоты, предварительно проводили их дериватизацию с помощью ортофталевого альдегида (Henderson et al., www.agilent.com).

Оценку пригодности электрохимического панкреатического гидролизата рыбы для использования его в составе микробиологических питательных сред проводили согласно требованиям ФС 42-3378-97 в лаборатории ФГУ "Мурманский ЦСМ".

3. Обсуждение результатов

Ферментативные электрохимические гидролизаты были получены при тех же условиях, что и коммерческие ферментативные гидролизаты (ТУ-480-00001927-27-93). А именно, гидромодуль 1:1 (соотношение сырье:вода); электроэнзиматический гидролиз вели в течение 6 часов при температуре $48 \pm 2^\circ\text{C}$ и рН 7.8-8.0; далее создавали в реакционной среде величину рН = 4.4-4.5, при этом выделившиеся белки (с $MW \approx 67$ кД) отделяли фильтрацией после 12-ти часового отстаивания; доводили величину рН среды до нейтральных значений, фильтровали и сушили. Затем был изучен химический и аминокислотный состав экспериментальных гидролизатов.

На рис. 1 показано изменение концентрации аминного азота в процессе ферментации, которое свидетельствует о скорости расщепления белковых молекул с образованием свободных аминокислот и пептидных фрагментов. Для достижения необходимой концентрации аминокислот в конечном продукте (согласно ТУ-480-00001927-27-93) процесс ферментации белоксодержащего сырья необходимо вести 5-6 часов.

В табл. 1 приведены результаты химического и аминокислотного анализа ферментативных гидролизатов, полученных электрохимическим способом, и аналогичные показатели ферментативных гидролизатов, произведенных химическим методом, взятые из литературных источников.

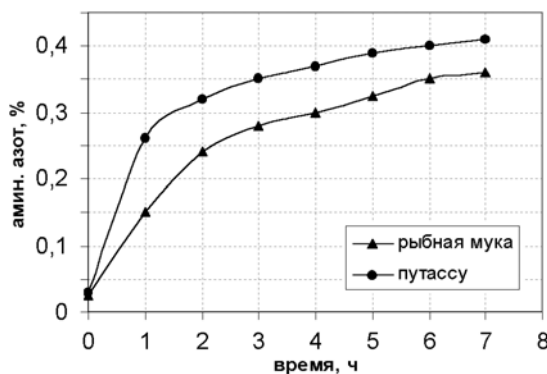


Рис. 1. Изменение концентрации аминного азота в процессе электроэнзиматического гидролиза рыбной муки и путассу

Таблица 1. Химический и аминокислотный состав ферментативных гидролизатов, полученных традиционным химическим и электрохимическим способами

Показатель, %	Ферментативный химический гидролиз		Электроэнзиматический гидролиз	
	Путассу / Панкреатин	РМ/ Панкреатин	Путассу / Панкреатин	РМ/ Панкреатин
N _{об.} %	10.87	13.3	10.05	12.66
N _{ам.} %	4.24	4.4	3.92	3.42
Степень гидролиза, %	39.0	33.1	39.0	27.5
NaCl, %	7.8		9.0	17.8
Содержание свободных аминокислот, %	21.49	19.5	23.28	20.9
Аспарагиновая	0.944	0.52	0.202	0.056
Глутаминовая	1.714	0.673	0.569	0.093
Серин	0.710	0.42	0.580	0.076
Гистидин	0.632	0.52	0.178	0.162
Глицин	0.248	0.20	1.422	0.583
Треонин	0.682	0.53	0.648	0.595
Аргинин	2.406	2.89	5.781	6.274
Аланин	1.528	1.02	1.659	0.429
Тирозин	1.566	1.35	1.84	0.895
Валин	1.092	1.29	1.055	0.194
Метионин	0.400	0.85	0.189	0.122
Триптофан	0.566	–	0.492	0.137
Изолейцин	–	1.04	0.716	0.376
Фенилаланин	2.052	2.14	1.53	1.315
Лейцин	4.244	2.96	5.144	2.782
Лизин	2.704	3.08	1.279	6.059

Содержание аминного и общего азота в сравниваемых гидролизатах практически одинаково, содержание NaCl не превышает допустимых значений (согласно ТУ-480-00001927-27-93). Степень гидролиза в ферментативных электрохимических гидролизатах составляет 27-40 %. Этот показатель соответствует высокой степени гидролиза белоксодержащего сырья и позволяет использовать полученные гидролизаты в микробиологии, как компоненты для приготовления питательных сред. Количество свободных аминокислот в электрохимических ферментативных гидролизатах на 5-10 % выше, чем в гидролизатах, полученных по ферментативной химической технологии (Телишевская, 2000; Мухин, Новиков, 2001; Артюхин и др., 1990). Кроме того, данные гидролизаты характеризуются более высоким (в 0.5-2.5 раза) содержанием глицина, аргинина, лейцина в обоих гидролизатах; аланина, тирозина и лейцина в гидролизате из рыбы (путассу) и лизина в гидролизате из рыбной муки.

Низкое содержание аспарагиновой и глутаминовой кислот, по всей видимости, можно объяснить тем, что в щелочной среде происходит ионизация обеих карбоксильных групп, поэтому эти аминокислоты могут легко перемещаться в анодное пространство. Пониженное содержание серина, гистидина и метионина можно объяснить длительным электрохимическим процессом, при котором возможно их электрохимическое разложение, например, декарбоксилирование.

Для определения возможности использования ферментативных электрохимических гидролизатов рыбы и рыбной муки в составе питательных сред были приготовлены питательный бульон и питательный агар на их основе. Анализ микробиологической активности проводили путем сравнения роста шести тест-культур: *Corynebacterium xerosis* 1911, *Staphylococcus aureus* Wood – 46, *Escherichia coli* 055 K59 3912/41, *Pseudomonas aeruginosa* 27/99, *Shigella flexneri* la 8516 и *Salmonella typhi* H – 901.

Качество питательного бульона на основе панкреатического гидролизата оценивали по следующим показателям: чувствительность к росту тест-культур; стабильность основных морфологических, культуральных, биохимических (образование индола и сероводорода) свойств; эффективность роста (выход биомассы с 1 мл среды). В качестве контрольной питательной среды использовали коммерческий питательный бульон (ГРМ-бульон), биологическое качество которого регламентируется ФС 42-3378-97.

Результаты чувствительности тест-культур на испытуемых средах приведены в табл. 2.

Таблица 2. Биологические показатели питательного бульона, приготовленного на основе электрохимического панкреатического гидролизата рыбы или рыбной муки и на основе коммерческого ГРМ-агара

Основа питательной среды	Кратность разведения	ТЕСТ-КУЛЬТУРЫ					
		<i>Corynebacterium xerosis</i> 1911	<i>Escherichia coli</i> 055 K59 3912/41	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27/99	<i>Staphylococcus aureus</i> Wood-46	<i>Shigella Flexneri</i> la 85/16	<i>Salmonella typhi</i> H-901
Электрохимич. панкреатич. гидролизат рыбной муки	10 ⁻⁶	Рост	Рост	Рост	Рост	Индол	H ₂ S
	10 ⁻⁷	Рост	Рост	Рост	Рост	Индол	H ₂ S
	10 ⁻⁸	Рост	Рост	Рост	Рост	Индол	H ₂ S
Электрохимич. панкреатич. гидролизат рыбы	10 ⁻⁶	Рост	Рост	Рост	Рост	Индол	H ₂ S
	10 ⁻⁷	Рост	Рост	Рост	Рост	Индол	H ₂ S
	10 ⁻⁸	Рост	Рост	Рост	Рост	Индол	H ₂ S
Коммерческий ГРМ-агар	10 ⁻⁶	Рост	Рост	Рост	Рост	Индол	H ₂ S
	10 ⁻⁷	Рост	Рост	Рост	Рост	Индол	H ₂ S
	10 ⁻⁸	Рост	Рост	Рост	Рост	Индол	H ₂ S

Как видно из данных табл. 2, питательный бульон, приготовленный на основе панкреатических электрохимических гидролизатов рыбной муки и путассу, по чувствительности тест-культур полностью удовлетворяет требованиям ФС 42-3378-97 к их биологическому качеству и даже превосходит их, так как максимальное разведение, в котором испытуемые штаммы тест-культур давали рост, составляет 10⁻⁸, что соответствует 10 КОЕ/мл. *Shigella flexneri* la 8516 сохраняла свою протеолитическую активность и образовывала индол, соответственно *Salmonella typhi* H-901 проявляла способность к образованию сероводорода.

Эффективность роста тест-культур или их всхожесть определяли на питательном агаре, для приготовления которого в качестве основы использовали гидролизат рыбной муки. Для сравнения и контроля количества засеваемого материала параллельно делали посев на коммерческий питательный агар, используемый для определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов. В качестве тест-культур применяли *Corynebacterium xerosis* 1911, *Staphylococcus aureus* Wood – 46, *Escherichia coli* 055 K59 3912/41, *Pseudomonas aeruginosa* 27/99.

Результаты посева тест-культур на питательный агар представлены в таблицах 3-4.

Как видно из данных, приведенных в таблицах 3 и 4, эффективность роста всех тест-культур на питательном агаре с использованием электрохимического панкреатического гидролизата рыбной муки сопоставима с всхожестью тест-культур на коммерческом питательном агаре. Эффективность роста тест-культур соответствует количеству микробных клеток в засеваемых объемах при пересчете на исходную взвесь, приготовленную по стандарту мутности на 10 единиц. Морфология колоний на питательном агаре с электрохимическим гидролизатом и на коммерческом питательном агаре является идентичной и соответствует паспортным данным тест-культур. Тест-культура *Pseudomonas aeruginosa* 27/99 продуцирует пигмент пиоцин сине-зеленого цвета при росте на обеих средах.

Таблица 3. Сравнительная характеристика эффективности роста тест-культур на питательном агаре с использованием гидролизата рыбной муки

Разведение и засеваемый объем	Питательный агар с коммерческим панкреатическим гидролизатом рыбной муки			
	<i>Escherichia coli</i> 055 K59 3912/41	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27/99	<i>Corynebacterium xerosis</i> 1911	<i>Staphylococcus aureus</i> Wood – 46
10 ⁻⁶ / 0.1 мл	0.6×10 ⁸	6.4×10 ⁸	8.2×10 ⁸	3.3×10 ⁸
10 ⁻⁷ / 0.5 мл	2.1×10 ⁸	6.3×10 ⁸	7.1×10 ⁸	4.7×10 ⁸
10 ⁻⁸ / 1.0 мл	2.0×10 ⁸	5.0×10 ⁸	1.1×10 ⁸	2.5×10 ⁸
Всего	1.5×10 ⁸	5.9×10 ⁸	8.8×10 ⁸	3.5×10 ⁸
Разведение и засеваемый объем	Питательный агар с электрохимическим панкреатическим гидролизатом рыбной муки			
	<i>Escherichia coli</i> 055 K59 3912/41	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27/99	<i>Corynebacterium xerosis</i> 1911	<i>Staphylococcus aureus</i> Wood – 46
10 ⁻⁶ / 0.1 мл	1.2×10 ⁸	8.3×10 ⁸	7.4×10 ⁸	3.9×10 ⁸
10 ⁻⁷ / 0.5 мл	1.4×10 ⁸	6.0×10 ⁸	7.9×10 ⁸	3.4×10 ⁸
10 ⁻⁸ / 1.0 мл	1.0×10 ⁸	0.5×10 ⁸	1.1×10 ⁸	4.0×10 ⁸
Всего	1.2×10 ⁸	7.9×10 ⁸	8.7×10 ⁸	3.8×10 ⁸

Таблица 4. Сравнительная характеристика эффективности роста тест-культур на питательном агаре с использованием гидролизата рыбы

Разведение и засеваемый объем	Питательный агар с коммерческим панкреатическим гидролизатом рыбы			
	<i>Escherichia coli</i> 055 K59 3912/41	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27/99	<i>Corynebacterium xerosis</i> 1911	<i>Staphylococcus aureus</i> Wood – 46
10 ⁻⁶ / 0.1 мл	2.7×10 ⁸	5.4×10 ⁸	8.0×10 ⁸	2.1×10 ⁸
10 ⁻⁷ / 0.5 мл	2.3×10 ⁸	5.0×10 ⁸	9.5×10 ⁸	1.3×10 ⁸
10 ⁻⁸ / 1.0 мл	1.5×10 ⁸	4.7×10 ⁸	7.5×10 ⁸	1.3×10 ⁸
Всего	2.2×10 ⁸	5.0×10 ⁸	8.7×10 ⁸	1.5×10 ⁸
	Питательный агар с электрохимическим панкреатическим гидролизатом рыбы			
10 ⁻⁶ / 0.1 мл	2.0×10 ⁸	7.2×10 ⁸	7.0×10 ⁸	3.0×10 ⁸
10 ⁻⁷ / 0.5 мл	3.5×10 ⁸	6.5×10 ⁸	5.6×10 ⁸	2.3×10 ⁸
10 ⁻⁸ / 1.0 мл	3.1×10 ⁸	5.0×10 ⁸	9.0×10 ⁸	1.9×10 ⁸
Всего	3.1×10 ⁸	6.2×10 ⁸	7.5×10 ⁸	2.4×10 ⁸

4. Вывод

Применение процесса электролиза водных растворов неорганических солей для получения гидролизатов из рыбы и рыбной муки в присутствии фермента – панкреатина позволяет на 5-10 % увеличить выход свободных аминокислот. В полученных гидролизатах увеличивается содержание глицина, аргинина, лейцина.

Результаты микробиологических исследований подтверждают возможность использования электрохимических гидролизатов для приготовления микробиологических питательных сред. Питательные среды на их основе для большинства тест-культур показали большую чувствительность, чем на коммерческом гидролизате. Полученные питательные среды не имеют отклонений в морфологии колоний. Электрохимические панкреатические гидролизаты рыбы и рыбной муки полностью соответствует требованиям ФС 42-3378-97.

Литература

- Henderson J.W., Ricker R.D., Bidlingmeyer B.A., Woodward C.** Part No 5980 – 1193E USA, Amino acid analysis using Zorbax eclipse – AAA columns and the Agilent 1100 HPLC [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.agilent.com/chem/supplies>. – Загл. с экрана.
- Артюхин В.И., Шепелин А.П., Киселева В.Н.** Белковые гидролизаты в производстве питательных сред: Производство и применение продуктов микробиологических производств. *Обзорная информация ВНИИСЭНТИ Минмедпрома СССР*, вып. 9-10, 52 с., 1990.
- Куприна Е.Э., Водолажская С.В., Няникова Г.Г.** Исследование процессов деструкции и гидролиза белков при их экстрагировании электрохимическим способом. *Журнал прикладной химии*, т.76, вып.4, с.663-666, 2003.
- Маслова Г.В., Егорова Е.С., Прокошенков А.А., Василевский П.Б.** Способ получения белкового гидролизата из гидробионтов. А.с. № 1687213 СССР, кл. А 23J 1/4. № 4755339/13; заявл. 07.08.89; опубл. 30.10.91, 5 с., 1991.
- Мухин В.А., Новиков В.Ю.** Ферментативные белковые гидролизаты тканей морских гидробионтов: получение, свойства и практическое использование. *Мурманск, Изд-во ПИИРО*, 97 с., 2001.
- Неклюдов А.Д., Иванкин А.В., Бердугина А.В.** Свойства и применение белковых гидролизатов. *Приклад. биохимия и микробиология*, т.36, № 5, с.525-534, 2000.
- Няникова Г.Г., Куприна Е.Н., Водолажская С.В.** Белковые гидролизаты, полученные из ракообразных электрохимическим способом, как основа микробиологических питательных сред. *Приклад. биохимия и микробиология*, т.39, № 4, с.489-492, 2003.
- Телишевская Л.Я.** Белковые гидролизаты. *М., Аграрная наука*, 295 с., 2000.