

УДК 664.95

Влияние продолжительности ферментализации на свойства белковых гидролизатов

К.В. Зотова, Ю.А. Кучина, А.Ю. Широнова, В.Ю. Новиков, С.Р. Деркач
Технологический факультет МГТУ, кафедра химии

Аннотация. Изучены физико-химические свойства ферментативных белковых гидролизатов. Показано, что с увеличением продолжительности процесса гидролиза вязкость гидролизатов уменьшается. Ферментативный гидролиз в течение 60 мин приводит к накоплению в гидролизате белковых фрагментов с молекулярной массой не более 100 кД.

Abstract. Physicochemical properties of enzymic protein hydrolysates have been investigated. It has been found out that the viscosity of the hydrolysates is decreasing with increase of the hydrolysis time. Enzymic hydrolysis being conducted during 60 minutes results the accumulation of protein fractions with molecular weight about 100 kDa in the hydrolysate.

Ключевые слова: ферментативный гидролиз, белковый гидролизат, степень гидролиза, вязкостные свойства, электрофорез, молекулярная масса

Key words: enzymic hydrolysis, protein hydrolysate, hydrolysis degree, viscosity properties, electrophoresis, molecular weight

1. Введение

В процессе промысла и переработки морских биоресурсов образуется большое количество неиспользуемого белоксодержащего сырья. Наиболее перспективным направлением утилизации белоксодержащих отходов является получение из них белковых гидролизатов, которые широко используются в медицинской, пищевой, комбикормовой и микробиологической промышленности (Мухин, Новиков, 2001; Пащенко, Сторублевцев, 2009).

В зависимости от области использования к белковым гидролизатам предъявляют разные требования, зависящие в первую очередь от степени гидролиза (Телишевская, 2000; Максимюк, 2009).

Целью работы является получение ферментативного белкового гидролизата и изучение влияния продолжительности ферментализации на свойства белковых гидролизатов.

2. Материалы и методы

В качестве белоксодержащего сырья использовали отходы от переработки рыб тресковых пород и ферментный препарат (ФП), выделенный из гепатопанкреаса камчатского краба, полученный ФГУП "Полярный научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии им. Н.М. Книповича" (ПИНРО). Ферментализацию проводили при температуре 50 °С и значениях pH = 7,5-8,0 в течение 1,5 ч, соотношение масс сырья, воды и ФП 1:1:0,006. Для изучения влияния продолжительности процесса гидролиза на физико-химические свойств белковых гидролизатов проводили отбор проб через определенные интервалы времени: 15, 30, 60, 75 и 90 мин. Отобранную пробу нагревали до 100 °С для остановки процесса ферментализации и фильтровали для удаления негидролизованых белковых фрагментов.

Изучение влияния гидромодуля (массового соотношении сырья и воды) и продолжительности процесса ферментализации на изменение эффективной вязкости (η) проводили при температуре 20±0,5 °С в условиях сдвиговой деформации в диапазоне скоростей сдвига $\dot{\gamma}$ от 0,053 до 108,6 с⁻¹. Белоксодержащее сырье предварительно измельчали на волчке с диаметром отверстий решетки 5 мм, смешивали с водой в массовом соотношении 1:0,5, 1:1, 1:2 (гидромодуль реакционной среды) и оставляли для набухания на 30-40 мин. Эффективную вязкость определяли на ротационном вискозиметре с контролируемой скоростью сдвига "Полимер РПЭ-1М.2" с термостатируемой измерительной ячейкой в виде двух коаксиальных цилиндров. Напряжение сдвига (τ) рассчитывали по уравнению:

$$\tau = \eta \dot{\gamma},$$

где η – эффективная вязкость; Па с, $\dot{\gamma}$ – скорость сдвига, с⁻¹.

Значение критерия Рейнольдса, рассчитанное для прибора с выбранными геометрическими размерами цилиндров, составило 195, что подтверждает ламинарный характер течения при измерении эффективной вязкости.

Кинематическую вязкость (ν) гидролизатов определяли методом капиллярной вискозиметрии на стеклянном вискозиметре ВПЖ-2 с диаметром капилляра 0,56 мм. Измерения проводили при температуре $20 \pm 0,5$ °С, пробы предварительно термостатировали в течение 30 мин (Малкин, Исаев, 2010).

Эффективность процесса ферментализации определяли по изменению степени гидролиза (h), которую рассчитывали как отношение аминного азота к общему ($[N_{ам.}/N_{об.}] \times 100, \%$). Содержание общего ($N_{об.}$) и аминного ($N_{ам.}$) азота определяли в соответствии с ГОСТом 7636-85.

Разделение смеси белковых веществ, входящих в состав сырья и гидролизата, и определение их молекулярного состава, выполняли методом неградиентного электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Этот метод позволяет разделять белки в широком диапазоне молекулярных масс (Якубке, Ешкәйт, 1985; Westermeier, 1993).

Для электрофоретических измерений образцы гидролизата объемом 500 мкл смешивали с буферным раствором в соотношении 1:1 и выдерживали на водяной бане при 95 °С в течение 3 мин. Полученные пробы наносили на гелевую пластину. Электрофорез проводили при температуре 15 °С, напряжении 600 В, силе тока 50 мА, мощности 30 Вт. Для окрашивания пластин использовали метод Кумасси (Остерман, 1981). Молекулярную массу белковых фракций определяли по калибровочному графику. Для построения калибровочного графика использовали стандартные маркеры – белковые соединения с известной молекулярной массой (14,4-94 кД). Анализ выполняли в лаборатории биохимии и технологии гидробионтов ПИПРО.

3. Результаты и их обсуждение

Зависимость эффективной вязкости и напряжения сдвига от скорости сдвига (кривые течения белоксодержащего сырья) при различном гидромодуле реакционной среды представлена на рис. 1.

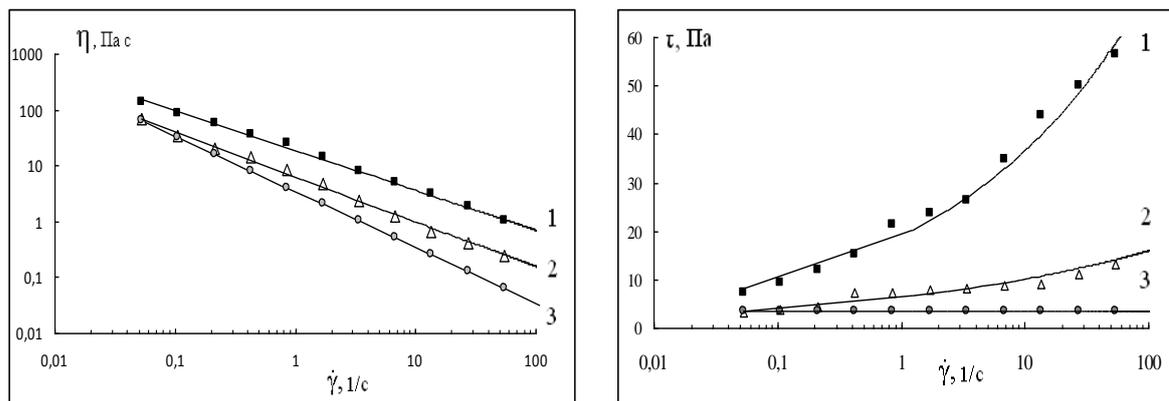


Рис. 1. Кривые течения белоксодержащего сырья при различном массовом соотношении сырья и воды: 1 – гидромодуль 1:0,5; 2 – гидромодуль 1:1; 3 – гидромодуль 1:2

Анализ кривых течения, приведенных на рис. 1, показал, что увеличение гидромодуля реакционной среды с 1:0,5 до 1:1 приводит к резкому уменьшению эффективной вязкости. Дальнейшее разбавление системы практически не оказывает существенного влияния на измеряемые параметры. Поэтому увеличение гидромодуля до значения 1:2 нецелесообразно, т.к. вязкостные характеристики реакционной среды практически не изменяются. Поскольку на соответствующей стадии технологического процесса гидролизат подвергают сушке, то его разбавление также нежелательно, т.к. приведет к увеличению общих экономических затрат.

Вязкостные свойства гидролизата в процессе ферментализации оценивали по изменению кинематической вязкости (ν , мм²/с). На рис. 2 представлена зависимость изменения кинематической вязкости гидролизата от концентрации аминного азота и продолжительности процесса ферментализации при гидромодуле 1:0,5.

Из данных, представленных на рис. 2, следует, что с увеличением продолжительности ферментативного гидролиза в гидролизате увеличивается содержание аминного азота и уменьшается кинематическая вязкость, достигая практически постоянных значений за 30 мин от начала опыта.

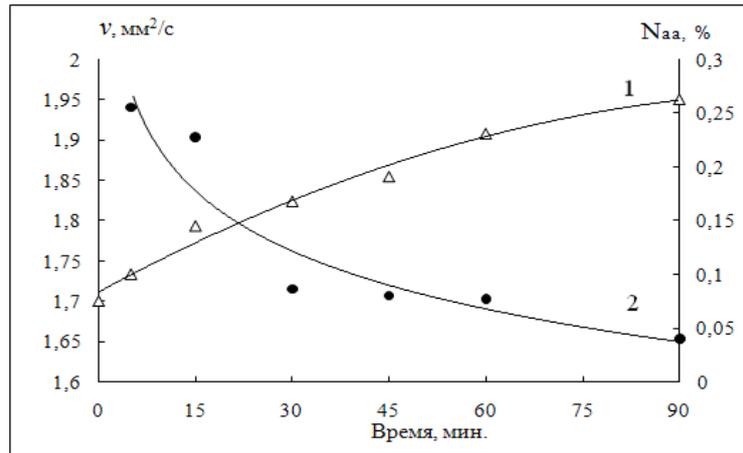


Рис. 2. Изменение концентрации аминного азота (1) и кинематической вязкости (2) в процессе ферментолиза

Изменение вязкости и степени гидролиза в процессе ферментолиза (гидромуль реакционной среды 1 : 0,5) представлено на рис. 3. Динамическую вязкость рассчитывали по формуле:

$$\eta = \nu\rho,$$

где ν – кинематическая вязкость, мм²/с, ρ – плотность, г/см³.

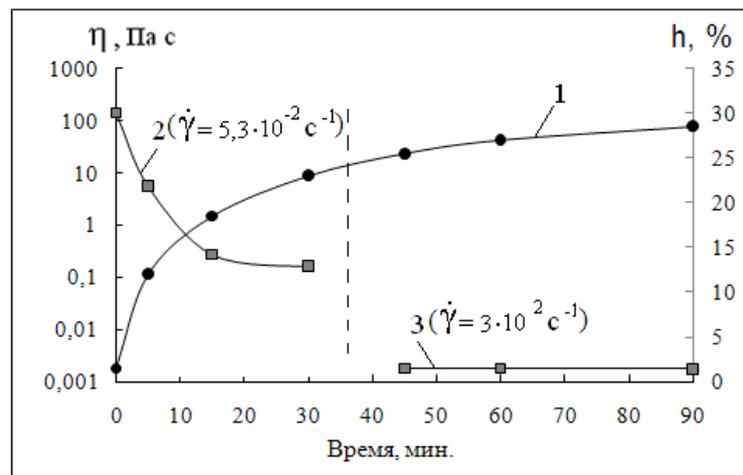


Рис. 3. Изменение в процессе ферментолиза степени гидролиза (1) и вязкости, измеренной методом ротационной (2) и капиллярной (3) вискозиметрии

Как видно из данных, представленных на рис. 3, степень гидролиза и вязкость гидролизата уменьшаются при увеличении времени ферментолиза. Наибольшее изменение степени гидролиза и эффективной вязкости наблюдается за первые 15 мин гидролиза. Динамическая вязкость реакционной среды в начале процесса составила 140 Па с, что свидетельствует о наличии высокомолекулярных фракций и позволяет рассматривать данную систему как гетерогенную. После 30 мин ферментолиза динамическая вязкость уменьшилась до значений 0,16 Па с, а через 45 мин до значений $0,18 \times 10^{-2}$ Па с. Такое значительное уменьшение вязкости позволяет рассматривать данную систему как гомогенную.

Изменение вязкости и степени гидролиза хорошо коррелируется с изменением молекулярно-массового состава гидролизата, что также связано с образованием более мелких белковых фрагментов (Широнина и др., 2009; Нгуен Хай Иен и др., 2009).

На рис. 4 представлена электрофореграмма ФП, выделенного из гепатопанкреаса камчатского краба (позиция 2), белоксодержащего сырья (позиция 3) и образцов гидролизатов, полученных в течение разных периодов времени (позиция 4-8). Для калибровки и получения возможности обработки данных на электрофореграмме также была разделена смесь белков с известной молекулярной массой – стандартные маркеры (Pharmacia Biotech) (позиция 1).

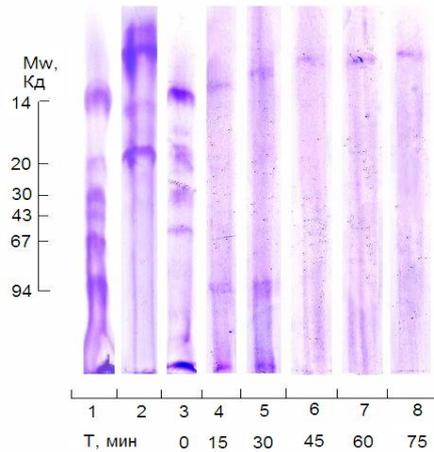


Рис. 4. Электрофореграмма высокомолекулярных белковых соединений.
 1 – Стандартные маркеры (Pharmacia Biotech); 2 – ФП из гепатопанкреаса камчатского краба;
 3 – негидролизованное сырье; образцы гидролизатов: 4 – 15 мин гидролиза;
 5 – 30 мин гидролиза; 6 – 45 мин гидролиза; 7 – 60 мин гидролиза; 8 – 75 мин гидролиза

Из рис. 4 следует, что в процессе электрофореза произошло разделение компонентов смеси белковых веществ, содержащихся в образцах, по молекулярным массам. Ферментный препарат (позиция 2) имеет в своем составе ряд высокомолекулярных соединений белковой природы. Негидролизованное сырье также представляет собой смесь высокомолекулярных белковых фракций, молекулярная масса которых лежит в интервале от 200 до 10 кД и выше (позиция 3). Результаты проведенного эксперимента позволяют предположить, что электрофоретическое разделение негидролизованных белковых фракций, содержащихся в сырье, прошло не полностью. Часть фракций осталась в начале гелевой пластинки. Это, по всей видимости, связано с их высокой молекулярной массой (больше 200 Кд).

По мере увеличения продолжительности гидролиза сырья молекулярная масса белковых фракций, содержащихся в нем, постепенно уменьшается. После 30-минутного гидролиза (позиция 5) в пробе еще наблюдается присутствие веществ с молекулярной массой больше 90 кД. Через 45 мин после начала гидролиза такие вещества уже не обнаруживаются (позиция 6). В пробе, гидролизованной в течение 1 ч, присутствуют вещества с молекулярной массой менее 14 кД (позиция 7). Результаты электрофореза образцов 6 и 8 показывают, что гидролизаты имеют в своем составе низкомолекулярные белковые соединения, что говорит об эффективности процесса гидролиза.

Следует отметить, что уже через 15 мин после начала гидролиза в пробе появляются белковые фракции с молекулярной массой менее 10 кД (позиция 3-8), а часть обнаруженных в негидролизованном сырье фракций с молекулярной массой больше 200 Кд начинают разрушаться с образованием новых соединений белковой природы с меньшими молекулярными массами.

По результатам электрофореза составлена схема, описывающая изменение фракционного состава образцов в процессе ферментативного гидролиза (рис. 5).

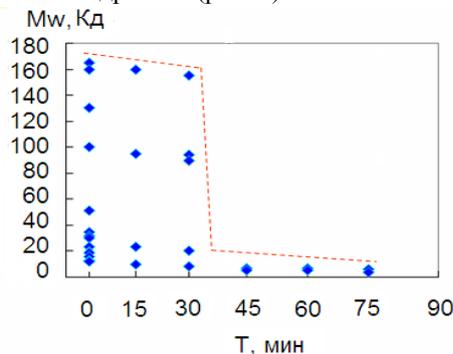


Рис. 5. Молекулярно-массовое распределение белковых фракций в гидролизате в зависимости от продолжительности ферментализации

4. Заключение

1. Методом электрофореза исследована кинетика гидролиза, проведена оценка молекулярно-массового состава гидролизатов, полученных на различных стадиях гидролиза. Показано, что при проведении ферментативного гидролиза при $\text{pH} = 7,5$; $t = 50^\circ\text{C}$ в течение 60 мин происходит полное расщепление высокомолекулярных белковых фракций. В гидролизате содержатся фракции белковых молекул с молекулярной массой не более 100 кД.

2. Вязкость белковых гидролизатов зависит от времени протекания ферментативного гидролиза и характеризует эффективность процесса ферментализации. Динамическая вязкость реакционной среды в начале процесса составила 140 Па·с, что свидетельствует о наличии высокомолекулярных фракций и позволяет рассматривать данную систему как гетерогенную. После 45 мин ферментализации динамическая вязкость снизилась до значений $0,18 \times 10^{-2}$ Па·с. Такое значительное уменьшение вязкости белкового гидролизата позволяет рассматривать данную систему как гомогенную.

Научно-исследовательская работа выполнена в рамках реализации ФЦП "Научные и научно-педагогические кадры инновационной России" на 2009-2013 гг.

Литература

- Westermeier R.** Electrophoresis in practice. *New York (USA): VCH Publishers Inc.*, 277 p., 1993.
- Максимюк Н.Н.** О преимуществах ферментативного способа получения белковых гидролизатов. *Фундаментальные исследования*, № 1, с.34-35, 2009.
- Малкин А.Я., Исаев А.И.** Реология: концепции, методы, приложения. *СПб., ЦОП "Профессия"*, 560 с., 2010.
- Мухин В.А., Новиков В.Ю.** Ферментативные белковые гидролизаты тканей морских гидробионтов: получение, свойства и практическое использование. *Мурманск, ПИИРО*, 97 с., 2001.
- Нгуен Хай Иен, Новикова М.В., Зорин С.Н.** Молекулярно-массовое распределение фракций ферментативных гидролизатов из дрейссен и мидий. *Рыбпром: технологии и оборудование для переработки водных биоресурсов*, № 1, с.43-45, 2009.
- Остерман Л.А.** Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). *М., Наука*, 288 с., 1981.
- Пашенко В.Л., Сторублевцев С.А.** Разработка технологии функционального продукта с применением коллагенового гидролизата. *Фундаментальные исследования*, № 4, с.127-134, 2009.
- Телишевская Л.Я.** Белковые гидролизаты: получение, состав, применение. *Под ред. А.Н. Панина. М., Аграрная наука*, 295 с., 2000.
- Широнина А.Ю., Деркач С.Р., Новиков В.Ю.** Получение и описание состава гидролизата, полученного из отходов рыбоперерабатывающей промышленности. *Рыбное хозяйство*, № 6, с.79-82, 2009.
- Якубке Х.-Д., Ешкайт Х.** Аминокислоты, пептиды, белки. *Под ред. Ю.В. Митина. М., Мир*, 455 с., 1985.