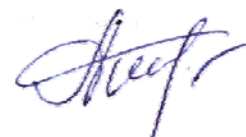


ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО РЫБОЛОВСТВУ  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
«МУРМАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи



ШИРОНИНА АНАСТАСИЯ ЮРЬЕВНА

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПРОТЕОЛИЗА РЫБНЫХ БЕЛКОВ  
И ИЗУЧЕНИЕ КОЛЛОИДНО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ГИДРОЛИЗАТОВ

05.18.04 Технология мясных, молочных и рыбных продуктов  
и холодильных производств  
02.00.11 Коллоидная химия

Диссертация на соискание учёной степени кандидата технических наук

Научные руководители:  
доктор химических наук, профессор  
Деркач Светлана Ростиславовна;  
кандидат химических наук  
Новиков Виталий Юрьевич

Мурманск 2015

## Содержание

Введение	4
Глава 1. Обзор литературы	10
1.1. Получение ферментативных белковых гидролизатов из рыбного сырья	10
1.2. Коллоидно-химические свойства белковых гидролизатов и области их применения	32
Глава 2. Объекты исследования	41
2.1. Белоксодержащее сырье	41
2.2. Ферментный препарат	46
2.3. Ферментативный белковый гидролизат	50
Глава 3. Методы исследования	55
3.1. Определение компонентного состава сырья	55
3.2. Определения протеиназной активности ферментных препаратов	55
3.3. Определение степени гидролиза	56
3.4. Метод ПААГ-электрофореза	57
3.5. Реологические методы	63
3.5.1. Ротационная вискозиметрия	63
3.5.2. Капиллярная вискозиметрия	63
3.6. Атомно-абсорбционная спектроскопия	64
3.7. Микробиологический анализ белковых гидролизатов	65
3.8. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)	66
3.9. Метод квазиупругого рассеяния света	67
3.10. Определение стабильности и реологических характеристик эмульсий «углеводород – раствор гидролизата»	67
3.11. Сканирующая электронная микроскопия	68
Глава 4. Результаты и обсуждение	69
4.1. Кинетические закономерности протеолиза белоксодержащего сырья – отходов рыбопереработки	69

4.1.1. Продолжительность гидролиза	69
4.1.2. Вид сырья	74
4.1.3. Тип ферментного препарата	79
4.1.4. Концентрация ферментного препарата	81
4.2. Автолиз ферментного препарата	85
4.3. Эффект способа внесения фермента	89
4.4. Молекулярно-массовое распределение белковых фракций в гидролизате по данным электрофореза	99
4.5. Кинетическая модель ферментативного гидролиза	104
4.6. Определение технологических параметров, близких к оптимальным, при ферментативном гидролизе белоксодержащего рыбного сырья	111
Глава 5. Коллоидно-химические свойства ферментативных белковых гидролизатов	115
5.1. Вязкость растворов гидролизатов	115
5.2. Морфология поверхности и размер частиц	116
5.3. Поверхностное натяжение	118
5.4. Эмульгирующая способность гидролизатов	119
5.5. Реологические характеристики эмульсий на основе гидролизатов	123
5.6. Аминокислотный состав	124
5.7. Содержание микроэлементов	125
Глава 6. Применение ферментативных белковых гидролизатов в качестве основы для микробиологических питательных сред	127
6.1. Питательный бульон	127
6.2. Питательный агар	129
Глава 7. Расчет экономической эффективности получения ферментативного белкового гидролизата из белоксодержащего рыбного сырья	136
Выводы	139

Литература

**141**

Приложения

**158**

## **Введение**

**Актуальность темы.** Продукты, содержащие различные аминокислоты и их производные, в настоящее время широко используются в пищевой, микробиологической промышленности, медицине и в производстве комбикормов. Одно из ведущих мест среди таких продуктов занимают ферментативные белковые гидролизаты, получаемые из отходов переработки гидробионтов, в том числе рыбы, добываемой в морях и океанах. Задача разработки эффективных технологий рыбных гидролизатов является актуальной, поскольку она неразрывно связана с проблемой безотходного рационального использования морских биологических ресурсов, что чрезвычайно важно как с научной, так и с экономической точки зрения.

**Степень разработанности проблемы.** Теоретические проблемы, связанные с изучением гидролиза белков, входящих в состав морских гидробионтов, и с производством ферментативных рыбных гидролизатов, комплексно изучаются в последние годы в лаборатории биохимии и технологии Полярного научно-исследовательского института рыбного хозяйства и океанографии им. Н.М. Книповича (ПИНРО) (г. Мурманск). Полученные результаты опубликованы в работах В.А. Мухина и В.Ю. Новикова с сотр. Существенный вклад в исследование проблемы внесли работы российских ученых (Н.В. Долгановой, А.Д. Неклюдова, Л.Я. Телишевской, В.И. Артюхина), а также зарубежных ученых (S.F. See, R. Slizyte, J. Wasswa, Y. Thiansilakul и др.).

Одним из перспективных путей совершенствования технологий гидролизатов является направленное регулирование процесса ферментализации на основе изучения его кинетики с целью получения гидролизатов с заданными коллоидно-химическими свойствами.

Сложность установления механизма и построения физико-химической модели протеолиза связана со спецификой процесса, в котором и субстрат и катализатор (фермент) являются биополимерами. С технологической, а также химической точки зрения интерес представляют, прежде всего, кинетические

закономерности ферментативного гидролиза, которые до настоящего времени подробно не изучены.

**Цель и задачи работы.** Цель работы заключалась в исследовании кинетических закономерностей ферментативного гидролиза белоксодержащего рыбного сырья для совершенствования технологии белковых гидролизатов и повышения устойчивости эмульсионных систем, стабилизированных гидролизатами.

Для достижения указанной цели решались следующие задачи:

1. Изучение кинетики реакции ферментативного гидролиза (протеолиза) белоксодержащего рыбного сырья на примере отходов переработки рыбного сырья (атлантической трески, путассу и золотистого морского окуня).

2. Описание механизма протеолиза и разработка кинетической модели, учитывающей промежуточные стадии реакции.

3. Определение технологических режимов получения белковых гидролизатов по усовершенствованной технологии, основанной на многократном введении ферментативного препарата гепатопанкреатина.

4. Проведение сравнительного анализа коллоидно-химических свойств белковых гидролизатов, полученных по традиционной и предложенной (усовершенствованной) технологии.

5. Изучение стабилизирующих свойств ферментативных рыбных гидролизатов в эмульсионных системах.

6. Оценка возможности использования гидролизатов, полученных по усовершенствованной технологии, в составе микробиологических питательных сред.

**Научная новизна.** Разработан способ совершенствования технологии ферментативных гидролизатов из белоксодержащего рыбного сырья путем многократного введения фермента в реакционную смесь.

Предложена кинетическая модель и механизм ферментативного гидролиза, включающий промежуточные стадии расщепления легко- и трудно гидролизуемых белков, а также автолиз фермента. В рамках модели рассчитаны

константы скорости реакции ферментативного гидролиза белоксодержащего рыбного сырья.

Определен фракционный состав, а также размер частиц, термодинамические поверхностные характеристики и реологические свойства водных дисперсий ферментативных рыбных гидролизатов. Установлено, что гидролизаты, полученные по усовершенствованной технологии, характеризуются высоким содержанием свободных аминокислот.

Показано стабилизирующее действие ферментативных рыбных гидролизатов в пищевых эмульсиях типа масло-в-воде. Разработан способ повышения устойчивости таких эмульсий.

Обоснована возможность использования гидролизатов, полученных по усовершенствованной технологии, в составе микробиологических питательных сред.

**Теоретическая и практическая значимость.** Усовершенствована технология ферментативных белковых гидролизатов из рыбного сырья – отходов рыбопереработки.

Предложенная кинетическая модель процесса ферментативного гидролиза позволяет оценивать степень гидролиза белков в готовом продукте в зависимости от выбранной схемы технологической обработки.

На основании опытно-промышленных испытаний, проведенных на базе лаборатории биохимии и технологии ПИНРО, разработана и утверждена технологическая инструкция по получению ферментативного белкового гидролизата из отходов рыбопереработки. В учебно-экспериментальном цехе МГТУ изготовлена опытная партия ферментативного гидролизата из отходов переработки тресковых видов рыб.

В ФГУ «Мурманский ЦСМ» проведены микробиологические испытания ферментативных белковых гидролизатов, полученных по усовершенствованной схеме, на соответствие требованиям фармакопейной статьи ФС-42-3378-97 «Питательный агар для культивирования микроорганизмов сухой (ГРГ-агар)». Установлено, что гидролизаты, полученные по усовершенствованной

технологии, могут быть использованы в составе микробиологических питательных сред.

**Методология и методы исследования.** Методологической основой диссертации служат опубликованные труды по проблемам переработки малоценного рыбного сырья и рыбных отходов, а так же общенаучные подходы изучения кинетики ферментативного гидролиза рыбных белков и коллоидно-химических свойств белковых гидролизатов.

В работе использованы стандартные методики и современные методы исследования, применяемые при изучении гидролиза белков и свойств белковых веществ.

Для анализа, математического моделирования и обработки материала использовались приложения Maple 15 и Microsoft Office.

#### **Положения, выносимые на защиту**

1. Результаты изучения влияния основных факторов ферментативного гидролиза (вид белоксодержащего сырья, продолжительность, тип фермента, концентрация фермента) на качество рыбных гидролизатов.

2. Усовершенствованная технология ферментативных гидролизатов из белоксодержащего рыбного сырья – отходов рыбопереработки.

3. Кинетическая модель ферментативного гидролиза, учитывающая многостадийный механизм реакции.

4. Сравнительный анализ аминокислотного состава и коллоидно-химических свойств ферментативных рыбных гидролизатов, полученных по традиционной и усовершенствованной технологии.

5. Результаты микробиологических исследований ферментативных гидролизатов в составе питательных сред.

6. Технологическая инструкция на получение ферментативного белкового гидролизата из отходов рыбопереработки.

**Степень достоверности и апробация работы.** Достоверность результатов исследования обеспечена проработкой автором литературных источников по теме диссертации, правильной постановкой



экспериментальных исследований, применением современных методик и методов исследования, воспроизводимостью полученных результатов и их математической обработкой, а также публикацией основных положений диссертации.

Основные результаты диссертации были представлены на III и IV Международных конференциях по коллоидной химии и физико-химической механике (Москва, 2008, 2013), Международной конференции «Достижения супрамолекулярной химии и биохимии в ветеринарии и зоотехнии» (Москва, 2008), XXVIII Международной конференции «Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоемов Европейского севера» (Петрозаводск, 2009). Результаты работы представлены на Международной рыбопромышленной выставке «Море. Ресурсы. Технологии» (Мурманск, 2011, 2014), Международной рыбохозяйственной выставке «Экспофиш» (Москва, 2011), конференции «Научно-прикладные проблемы химической технологии минерального сырья и гидробионтов Кольского региона» (Мурманск, 2009), Международном симпозиуме «Экология арктических и приарктических территорий» (Архангельск, 2010), Европейской конференции по реологии (Суздаль, 2011), III Конференции молодых ученых «Реология и физико-химическая механика гетерофазных систем» (Суздаль, 2011), 25-й конференции Европейского общества по коллоидной химии и межфазным явлениям (Берлин, Германия, 2011), 14-й конференции Международной ассоциации ученых в области коллоидной химии и поверхностных явлений (Сендай, Япония, 2012). Результаты работы представлялись на ежегодных научно-технических конференциях Мурманского государственного технического университета «Наука и образование» (Мурманск, 2008-2015).

Экспериментальная часть работы выполнена в рамках НИР по теме «Разработка композиций белков с поверхностно-активными веществами и полисахаридами с целью улучшения показателей качества пищевых продуктов» (ГР №01200904207), включенной в тематический план научных исследований Мурманского государственного технического университета. Частично работа

выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 11-03-09530-моб\_з).

**Внедрение результатов исследования.** На основании исследований и опытно-промышленных испытаний разработаны и утверждены технические условия и технологическая инструкция по получению ферментативного белкового гидролизата из отходов рыбопереработки.

Результаты изучения кинетических закономерностей ферментативного гидролиза белоксодержащего сырья и способов изменения коллоидно-химических характеристик белковых гидролизатов внедрены в учебный процесс для бакалавров направлений «Биология», а также магистров, обучающихся по направлениям «Биология» и «Химия».

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 19 печатных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых отечественных изданиях из списка ВАК и 15 статей в материалах международных и российских конференций. Подана заявка № 2012143161/10 (069304) на патент «Способ получения ферментативного белкового гидролизата из отходов рыбообработывающей промышленности».

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, 7 глав, заключения, списка использованных источников и 5 приложений. Работа изложена на 157 страницах, содержит 28 таблицу и 58 рисунка. Список литературы включает 155 наименований.

## Глава 1. Обзор литературы

### 1.1. Получение ферментативных белковых гидролизатов из рыбного сырья

Малоценное, некондиционное рыбное сырье, отходы рыбоперерабатывающей промышленности, а также малоизученные и нетрадиционные виды гидробионтов являются крупным источником полноценного белка, который может стать доступным для практического использования при применении эффективных научно-обоснованных технологий их переработки.

В настоящее время существует множество научных трудов, посвященных возможности использования этого сырья в производстве ценной богатой белком продукции для разных сфер деятельности человека.

Общепризнанной является проблема переработки отходов рыбной промышленности с целью получения полезной продукции. Активно исследуется ферментативный гидролиз рыбного сырья и пути оптимизации этого процесса [124, 142, 144]. В качестве протеолитических агентов часто используют Алкалазу или Флаворзим, имеющих соответственно микробное и грибное происхождение [119, 133, 135, 150].

Много лет ведутся исследования ферментативного способа переработки малоценных видов рыб для получения белковых концентратов и гидролизатов для пищевых продуктов [43, 86, 102, 103, 109].

Ряд научных работ посвящен описанию различных способов переработки рыбного сырья и получению из них белковых гидролизатов [38, 51, 62, 63, 64, 74, 75]. Изучаются функциональные свойства ферментативных гидролизатов и кинетика процесса их получения [124, 150]. В работах [42, 76] подробно изучены кинетические закономерности процесса ферментативного гидролиза белковых веществ и предложены модели определения констант гидролиза.

Также описаны химические и физико-химические характеристики сырья и гидролизатов и возможные пути и перспективы применения последних в науке и промышленности [7, 92, 94].

Ферментативные белковые гидролизаты предлагается использовать в качестве кормовых добавок, пищевых ингредиентов или компонентов медицинских препаратов [38, 52, 113, 123, 135]. Уже разработаны технологии применения гидролизатов из гидробионтов в качестве основ для функциональных продуктов питания [4, 14, 46].

В область научных интересов ряда авторов входит изучение протеолитической активности тканей гидробионтов [57, 59, 93, 100] и кинетические закономерности процесса гидролиза [58, 60, 140]. Исследуется также возможность производства кормовых добавок и микробиологических питательных сред на основе рыбных белковых гидролизатов [44, 60, 87, 88, 93].

Таким образом, поиск новых и совершенствование существующих технологий переработки рыбного сырья и рыбных отходов, а также получение продуктов с полезными свойствами является актуальной проблемой для современной науки.

#### *Способы получения белковых гидролизатов*

Одним из важных направлений в производстве продуктов из гидробионтов является их глубокая переработка, т.е. производство белковых гидролизатов – продуктов с высоким содержанием ценных биологически активных соединений: свободных аминокислот и полипептидов [19, 50, 63, 92].

В общем виде гидролиз белка представляет собой расщепление белковой молекулы с разрушением С-N связи ее первичной структуры (рис. 1.1). Этот процесс протекает под действием катализатора, в роли которого могут выступать кислоты и основания (в этом случае гидролиз называется химическим), или протеолитические ферменты (ферментативный гидролиз) [49, 50, 93, 110]. На рисунке 1.2 представлены основные способы гидролиза белковых веществ.

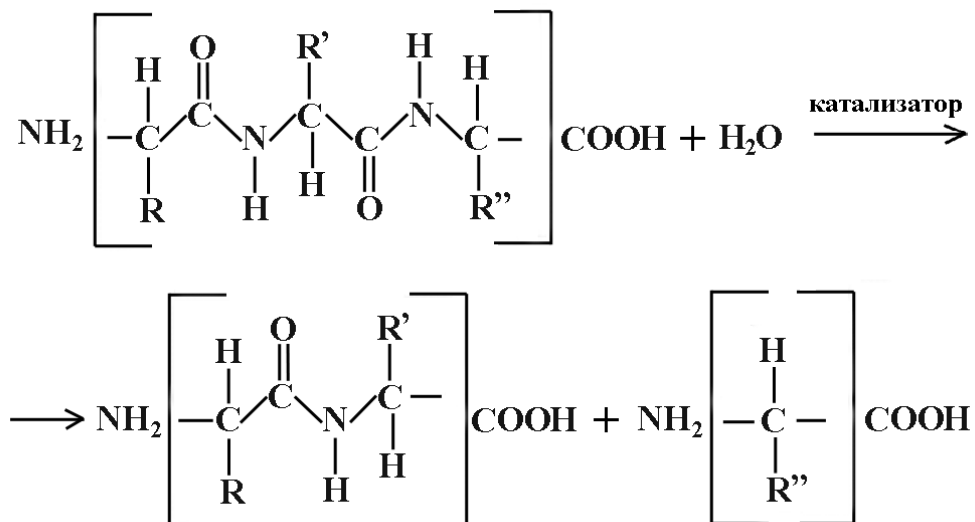


Рис. 1.1. Схема гидролиза C-N связи на примере трипептида

Химический гидролиз белка, в частности кислотный гидролиз с использованием HCl или H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> в качестве катализатора, является широко распространенным способом получения гидролизатов. В зависимости от концентрации используемой кислоты и температуры гидролиза время процесса может изменяться от 3 до 24-х часов. Например, гидролиз в присутствии серной кислоты проводят в течение 3÷5 часов при температуре 100÷130 °С и давлении 2÷3 атмосферы; в присутствии соляной - в течение 5÷24 часов при температуре кипения раствора под небольшим давлением [22, 35, 50, 56, 152].

При действии кислоты гидролиз белков достигается максимальная глубина расщепления белка и исключается возможность бактериального загрязнения гидролизата, что особенно важно в медицине.

Однако этот способ имеет недостаток — при таких достаточно жестких условиях гидролиза происходит увеличение не только количества аминного азота за счет образования низкомолекулярных пептидов и свободных аминокислот, но и аммиака, что указывает на разрушение самих аминокислот [26]. Так в ходе гидролиза происходит разрушение триптофана, треонина, серина [93], дезаминирование аспарагина и глутамина, разрушение витаминов. Особое

внимание следует уделять сохранности цистеина, так как он разрушается в достаточно большой степени и при кислотном гидролизе животного сырья.

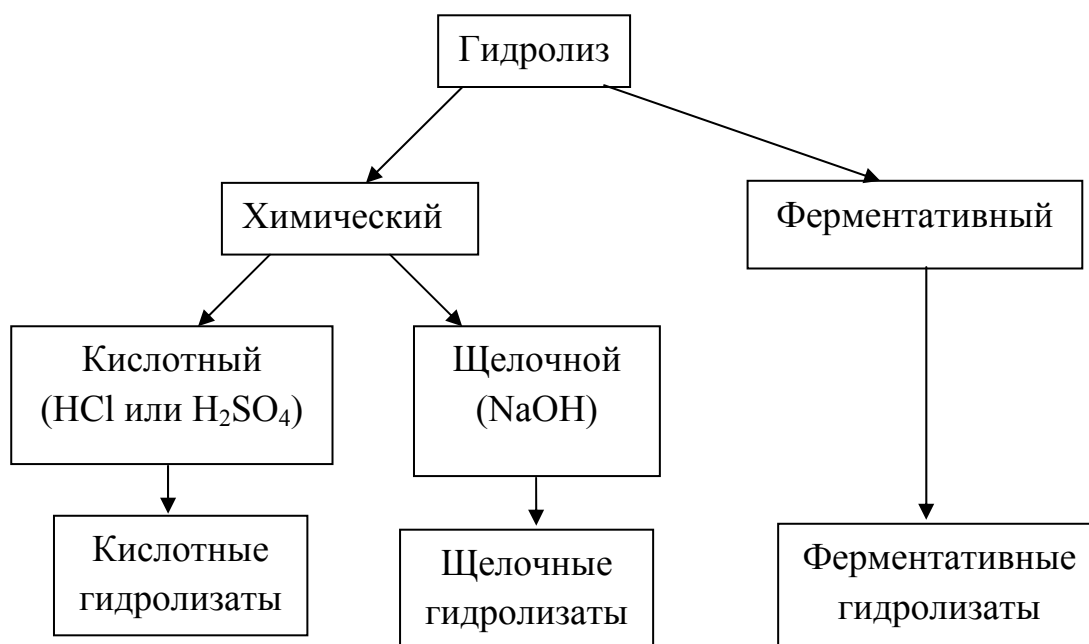


Рис. 1.2. Способы гидролиза белковых веществ

Продукты кислотного гидролиза имеют темно-коричневую окраску, что обусловлено образованием гуминовых веществ в результате полного разложения молекул белка [112] и продуктов реакции Майяра [79]. Удаление окрашенных соединений осуществляется с помощью активированного угля. Однако уголь адсорбирует некоторое количество аминокислот, а также способствует окислению цистина, который является биологически важной аминокислотой, разрушение которой нежелательно. Кроме того, при нейтрализации кислотных гидролизатов образуется большое количество побочных продуктов: хлоридов или сульфатов. Последние являются особенно токсичными для организма [50, 152].

Во избежание разрушения лабильных аминокислот в процессе получения кислотных гидролизатов, некоторые исследователи использовали мягкие режимы гидролиза в атмосфере инертного газа, а также добавляли к реакционной смеси антиоксиданты, тиоспирты или производные индола [50].

Щелочной способ редко используют для получения гидролизатов, поскольку при таком способе наблюдается рацемизация аминокислот (часть  $\alpha$ -аминокислот превращается в D-аминокислоты) и почти полное разрушение цистеина, лизина, цистина и аргинина [93]. Также при щелочном гидролизе белков образуются остатки лантанина и лизиноаланина, которые являются токсичными для организма человека и животных.

Кислотный и щелочной гидролиз имеют, кроме указанных, еще существенные ограничения, связанные с агрессивностью среды, что приводит к быстрой коррозии оборудования и вызывает необходимость соблюдения жестких требований техники безопасности. Таким образом, подобные технологии являются достаточно трудоемкими, химически вредным и экологически опасными [110], а сами гидролизаты нуждаются в последующей очистке с использованием сложной аппаратуры (ионообменные колонки, ультрафильтрационные мембраны и т.п.) [50].

Альтернативой химического расщепления белков служит ферментативный гидролиз, который осуществляется с помощью катализаторов белковой природы – ферментов, синтезируемых живой клеткой и активирующих биохимические процессы [98].

Ферментативный способ гидролиза является более предпочтительным по сравнению с химическими методами, т. к. ферменты обладают значительно более высокой специфичностью и эффективностью каталитического действия, а сам ферментативный гидролиз проводится в "мягких" условиях (при температуре  $35\div 50$  °С, значениях pH, близких к нейтральному и атмосферном давлении) [60, 90, 98], что способствует сохранению в готовом продукте (гидролизате) биологически активных веществ. В отличие от гидролизата, полученного химическим способом, аминокислоты в ферментативном гидролизате практически не разрушаются, не вступают в дополнительные реакции (рацемизация и другие) и присутствуют в нем в том же составе и соотношении, что и в исходном сырье. Кроме того, ферментативный гидролиз разрушает связь белка с жиром, что позволяет легко отделить последний от

исходного сырья и делает гидролизат стойким при хранении. Реакции, катализируемые ферментами, проходят без образования побочных продуктов. В процессе ферментативного гидролиза образуется сложная смесь продуктов распада белка, имеющих различную молекулярную массу. Соотношение продуктов зависит от свойств применяемого фермента, используемого сырья и условий проведения процесса. Гидролизаты, полученные методом ферментативного гидролиза, обычно содержат  $10 \div 15$  % общего азота и  $3,0 \div 6,0$  % аминного азота [60].

### *Технология ферментативного гидролиза белков*

Для расщепления белков к субстрату, который представляет собой негидролизованное белоксодержащее сырье, добавляют очищенные ферментные препараты или измельченные пищеварительные органы рыб или теплокровных животных, содержащие протеолитические ферменты [50, 132].

Если расщепление белка идет под действием гидролитических ферментов, содержащихся в самом субстрате, то процесс называют автопротеолизом (или автолизом) [2].

В случае использования автопротеолиза сырье должно обладать достаточно активным комплексом протеолитических ферментов [93]. Также необходимо создать оптимальные условия (рН, температура) для их действия [134].

Некоторые виды рыб (например, килька, мойва или сайка) обладают активной ферментной системой. После непродолжительного гидролиза при повышенной температуре (до  $65$  °С) структура белковых веществ разрушается до крупных высокомолекулярных полипептидов [105]. Протеолитические ферменты других видов рыб (красноперки, тарани) в меньшей степени активны и менее устойчивы к воздействию повышенной температуры. Степень дезагрегации белка при автолизе тканей этих видов рыб в оптимальных условиях (при температуре  $50$  °С, рН  $6,3$ ) в течение 5 часов составляет чуть более  $10$  % [109]. По мнению авторов исследования, достигнутая глубина гидролиза является недостаточной, т.к. практически не



позволяет получать биопродукты определенной функциональной направленности [103, 109].

В случае низкой активности собственных ферментных систем сырья к субстрату добавляют микроорганизмы или ферментные препараты [93].

В качестве таких препаратов используют комплексы ферментов животного, растительного или микробного происхождения, характеризующиеся широкой субстратной специфичностью и катализирующие расщепление не только пептидных связей, но и сложных эфирных связей в белковых макромолекулах [38, 53, 100]. К таким ферментным системам относят, например, культуру дрожжей *Hansenula montovides*, бактериальные протеиназы, препараты протосубтилина, папаина, бромелина, трипсина и другие. Из ферментов микробного происхождения чаще всего используют бактериальные и грибные протеиназы [133]. Количество вносимого ферментного препарата зависит от его активности [60].

Продолжительность гидролиза зависит от вида сырья и составляет от 4 до 12 ч. Для ускорения процесса смесь необходимо перемешивать.

Под воздействием комплекса протеолитических ферментов белок вначале разделяется на полипептиды. На этой стадии расщепляется около  $\frac{1}{3}$  начального количества субстрата. Отношение образовавшегося количества небелкового азота к общему азоту составляет 42-44 %. Эта стадия характеризуется высокой скоростью гидролиза. На второй стадии образуется 90-92% небелкового азота от общего азота. В дальнейшем рост небелкового азота прекращается. На третьей стадии дезагрегированные белки подвергаются дальнейшему распаду до низкомолекулярных продуктов гидролиза [93].

Эти реакции протекают как последовательно, так и одновременно. Поэтому на начальной стадии протеолиза обнаруживается сложная смесь высоко- и низкомолекулярных продуктов (полипептиды и аминокислоты). С течением времени количество полипептидов уменьшается, а содержание аминокислот в гидролизате увеличивается. Однако добиться полного

гидролиза белка до аминокислот практически не удается, так как активность ферментов снижается за счет ингибирования образующимися аминокислотами, которые взаимодействуют с активными группировками ферментов, за счет температурной инактивации или в результате автолиза [2, 93, 134]. Согласно опубликованным данным, при ферментативном гидролизе степень гидролиза белковых молекул (отношение аминного азота к общему) составляет не более 40-50 % [60].

Гидролиз белка приводит к полному нарушению гистологической структуры сырья и изменению его внешнего вида — исходное сырье превращается в густую сметанообразную массу. В ходе гидролиза вода, удерживаемая белками в структуре тканей, переходит в свободное состояние, в ней растворяются продукты гидролиза белка, а также в виде эмульсий жир, высвобождающийся за счет разрушения жировой ткани и белково-липидных комплексов [93].

Традиционная технологическая схема получения ферментативных белковых гидролизатов из гидробионтов включает в себя следующие основные стадии: измельчение сырья, ферментативный гидролиз белков, входящих в состав сырья, инактивация фермента, удаление балластных примесей (поверхностный слой) и нерасщепленных белков (осадок), очистка от взвешенных частиц (осветление раствора) и сушка полученного гидролизата [60, 68]. В качестве сырья для производства гидролизата может быть использовано рыбное сырье любой жирности, так как в ходе технологического процесса предусмотрено обезжиривание (сепарирование) жидкой части субстрата [93].

Под действием протеолитических ферментов, в частности, панкреатина или комплекса протеиназ, выделенного из гепатопанкреаса Камчатского краба гепатопанкреатина, в гидролизат превращается более 75 % исходного рыбного сырья, и только 25% его остаётся в виде негидролизованной массы, состоящей в основном из крупных костей [49].

По сравнению с химическими технологиями ферментативный способ получения гидролизатов обладает существенными достоинствами, главными из

которых являются: доступность и простота проведения, незначительная энергозатратность и экологическая безопасность.

### *Свойства и механизм действия ферментов*

Ферменты - специфические биологические катализаторы, присутствующие во всех живых клетках. Это важнейший класс белковых веществ, поскольку почти все биохимические реакции, протекающие в любом организме, катализируются соответствующими ферментами. [8, 12, 26, 59, 100].

Ферменты синтезируются микроорганизмами (бактерии [42, 99], грибы, дрожжи [5]), животными [57, 127] и растениями [122] и имеют белковую природу, их молекулярные массы, как и у всех остальных белков, лежат в пределах от 12 000 до 1 000 000. Их размеры могут превышать размеры субстратов или функциональных групп, с которыми они взаимодействуют (рис.1.3), и близки к размерам коллоидных частиц [20, 38, 53, 107].

Ферменты используются в качестве инструментов для осуществления тонкого химического органического синтеза в легкой, пищевой, микробиологической и фармацевтической промышленности (производство кормового белка, гормонов, антибиотиков и других лекарственных препаратов и L-аминокислот) [99].

Ферментативные процессы являются основой многих производств: хлебопечения, виноделия [90], пивоварения (амилолитические ферменты успешно заменяют солод) сыроделия, производства спирта, чая, уксуса. При выпечке хлеба внесение в тесто небольших количеств амилаз и протеиназ увеличивает газообразование, улучшает аромат изделий.

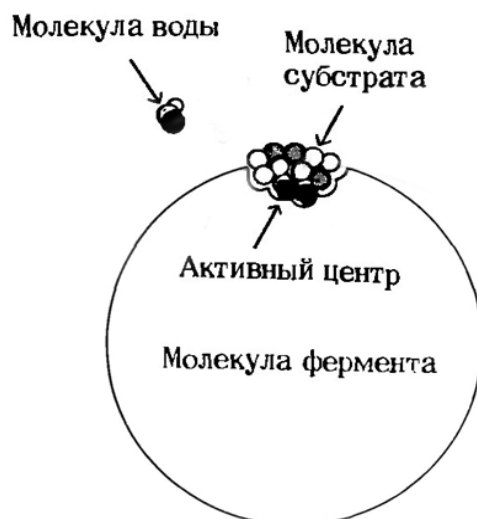


Рис. 1.3. Относительные размеры молекулы фермента и типичной молекулы субстрата [98].

Препараты протеолитических ферментов, получаемых из микроорганизмов, употребляются в кожевенной промышленности для удаления волос и смягчения сырья, а также для ускорения обработки мясных и рыбных продуктов. Препараты микробных пектолитических ферментов широко используют при производстве соков. Например, использование пектолитических ферментов позволяет резко повысить сокоотделение при производстве осветленных соков из плодов и ягод. Всё большее применение очищенные ферментные препараты находят в медицине для обработки лекарственных трав, при приготовлении различных видов лекарств и целебных экстрактов, при лечении различных заболеваний, например рака [92] или для аналитических целей, а также в генноинженерных исследованиях и биотехнологии. В научных исследованиях и в клинической практике высокоочищенные ферментные препараты служат в качестве специфических средств биохимического анализа [26, 55, 106, 131].

Ферменты разделяются на две большие группы:

- однокомпонентные, состоящие исключительно из белка и не содержащие химических групп, кроме тех, которые входят в состав аминокислотных остатков (например, рибонуклеаза);

- двухкомпонентные, состоящие из белка, называемого апоферментом, и небелковой части, ко-фактора. Роль ко-факторов могут играть неорганические вещества, например ионы  $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  или  $Zn^{2+}$  или сложные органические вещества, которые в этом случае носят названия ко-ферментов (производные витаминов или нуклеотидов). У одних ферментов коферменты или ионы металлов связываются с белком временно и непрочно, тогда как у других эти связи могут быть прочными и постоянными; в последнем случае небелковую часть фермента называют простетической группой.

Апофермент двухкомпонентных ферментов называют также белковым носителем, а простетическую группу – активной группой [12, 98].

Из белков животного происхождения в промышленности чаще всего используют пепсин, трепсин,  $\alpha$ -химотрипсин, карбокси- или аминопептидазы в чистом виде или в виде комплекса ферментов. Так, например, панкреатин, широко используется в медицинской промышленности для получения ферментативного гидролизата с последующим производством питательных сред [7]. Комплекс протеиназ, выделяемый из гепатопанкреаса камчатского краба гепатопанкреатин используется для изготовления гидролизатов пищевой, кормовой и технической продукции из гидробионтов [100].

Из ферментов микробного происхождения чаще всего используют бактериальные и грибные протеиназы. Последние, являясь в большинстве случаев смесью нескольких ферментов, обладают более широкой субстратной специфичностью и обеспечивают более глубокую степень гидролиза белка [24, 61, 62, 97].

Ферменты обладают всеми общими свойствами катализаторов, то есть они способствуют протеканию огромного числа химических реакций, осуществляемых каждую секунду во всех живых системах [13]. Но, по сравнению с

обычными катализаторами, все ферменты являются белками. Поэтому они обладают особенностями, отличающими их от обычных катализаторов [90, 98].

Эти особенности ферментов, иногда называют общими свойствами ферментов.

1. Ферменты способны резко повышать (в десятки и сотни миллиардов раз) скорость химических реакций.

Считается, что одной из наиболее существенных причин большой скорости ферментативных процессов является то, что ферменты выступают в роли полифункциональных катализаторов (содержат в своем составе сразу несколько активных центров, необходимых для промежуточных стадий реакции), обеспечивающих одновременное протекание процессов, являющихся в иных условиях многостадийными.

Также влияние на скорость протекания ферментативной реакции оказывает специфичность действия ферментов, т.е. высокая избирательная способность их взаимодействия с компонентами катализируемой реакции, обусловленная исключительной структурой белка (последовательностью соединения L-аминокислот и их пространственного расположения) [31].

От температуры также зависят такие факторы как изменение концентрации растворенного  $O_2$  вследствие изменения растворимости (в манометрических опытах) или pH используемого буферного раствора, что также может повлиять на исход ферментативной реакции [31].

2. Влияние температуры на скорость протекания ферментативной реакции данном случае может быть обусловлено действием ряда различных факторов. Температура влияет на стабильность фермента, на скорость распада фермент-субстратного комплекса, на сродство фермента к субстрату или к активаторам и ингибиторам (если таковые имеются). Если в системе участвуют несколько ферментов с различными температурными коэффициентами, температура может повлиять на природу ключевой реакции.

Для ферментативных реакций (как и для любых химических реакций) справедливо правило Вант-Гоффа: с повышением температуры на 10 °С скорость реакции возрастает в 2—4 раза:

$$V_{t_2} = V_{t_1} \cdot \gamma^{\Delta t/10} \quad (1.1)$$

где  $V_{t_2}$ ; - скорость при температуре  $t_2$ ;  $V_{t_1}$  - скорость при температуре  $t_1$ ,  $\Delta t = t_2 - t_1$ ;  $\gamma = 2 \div 4$  — температурный коэффициент.

При не достаточно высокой температуре скорость ферментативной реакции, как правило, невелика, а при температурах, близких к 0 °С, реакция практически полностью прекращается. Такие условия оптимальны для хранения мяса и рыбы и их созревания (Например, температура 0-3 °С является оптимальной для формирования основных органолептических, физико-химических и функционально-технологических показателей) [28, 81]. Однако при нагревании до 70 °С и выше скорость ферментативной реакции также снижается и, наконец, полностью прекращается. Снижение интенсивности действия фермента при этом объясняется главным образом его начинающимся разрушением (денатурацией), меняется структура активного центра, в результате фермент не может реагировать с субстратом [31, 57, 107].

Таким образом для сохранения активности фермента необходимо поддержание определенного температурного оптимума – температуры, достаточно высокой для наиболее эффективного протекания ферментативной реакции, но не способствующей разрушению молекул самого фермента. Для большинства ферментов температурный оптимум находится в диапазоне 35÷50 °С (для амилазы – 50 °С, пепсина и трипсина – 37 °С) [49]. В некоторых случаях (когда речь идет об автолизе рыбного сырья) она может составлять 50-55 °С [1].

### 3. Действие фермента зависит от реакции среды (рН).

В большинстве случаев для действия каждого фермента имеются оптимальные значения рН. Наибольшая биохимическая активность у большинства ферментов проявляется только при строго определённых концентрациях водородных ионов, и даже незначительные отклонения рН среды от оптимального значения приводит к изменению степени ионизации кислотных и основных групп аминокислот, входящих в состав фермента. Это вызывает изменение его конформации, в результате чего изменяется пространственная структура активного центра и снижается его сродство к субстрату. Кроме того, при экстремальных значениях рН происходит денатурация фермента и его инактивация. [23, 49].

Оптимальные значения рН для каждого фермента могут отличаться. Так, например, пепсин, содержащийся в желудочном соке, наиболее активен в сильнокислой среде (рН 1÷2); трипсин – протеолитический фермент, выделяемый поджелудочной железой, имеет оптимум действия в слабощелочной среде (рН 8÷9); оптимум действия папаина – протеолитического фермента растительного происхождения – находится в слабокислой среде (рН 5÷6) [57, 91].

#### *Кинетика ферментативного гидролиза*

Скорость реакции пропорциональна количеству молекул, свободная энергия которых равна или выше энергии их активации. Доля таких молекул обычно возрастает с повышением температуры.

Ферменты повышают скорость реакций путем снижения энергетического барьера вступающих в реакцию молекул. При взаимодействии субстрата с ферментом реакция протекает по новому механизму, характеризующемуся более низкой энергией активации молекул, чем реакции, протекающие в отсутствие фермента.



По некоторым данным, каждая молекула фермента в течение 2 секунд при температуре 37°C может взаимодействовать с более чем 500 молекулами вещества (субстрата), на которое она воздействует [8].

Эффективность ферментативного катализа достигается тем, что реакция разбивается на более простые и легкие реакции. Любая ферментативная реакция протекает через ряд промежуточных стадий [5, 42]. Различают три основных этапа ферментативного катализа.

1 этап - ориентированная сорбция субстрата на активном центре фермента с образованием обратимого E-S комплекса (фермент-субстратного). На этом этапе происходит взаимодействие адсорбционного центра фермента с молекулой субстрата (Рис. 1.4. а)). При этом и субстрат подвергается конформационной перестройке. Все это происходит за счет возникновения слабых типов связей между субстратом и адсорбционным центром фермента. В результате этого молекула субстрата подается на каталитический центр в наиболее удобном для него положении. Этот этап является легко обратимым, потому что здесь участвуют только слабые типы связей.

2 этап – химические превращения молекулы субстрата в составе фермент-субстратного комплекса с образованием комплекса фермента с химически преобразованным субстратом (Рис. 1.4. б)). Этот этап называется активацией субстрата. В нескольких точках активного центра происходит его связывание. Это приводит к изменению структуры субстрата, его деформации за счет изменения энергии связей в молекуле (разрываются одни ковалентные связи и возникают новые). Поэтому этот этап протекает значительно медленнее, чем 1-й и 3-й этапы. Именно скорость второго этапа определяет скорость всей ферментативной реакции в целом.

3 этап - десорбция готового продукта из его комплекса с ферментом (Рис. 1.4. в)). В результате превращения субстрата в новое вещество (продукт) последний утрачивает способность удерживаться в активном центре фермента и фермент-субстратный, вернее уже фермент-продуктный комплекс диссоциирует (распадается). Этот этап протекает легче, чем 2-й. Он, как и 2-й

этап, тоже необратим. Исключением являются обратимые ферментативные реакции. [98].

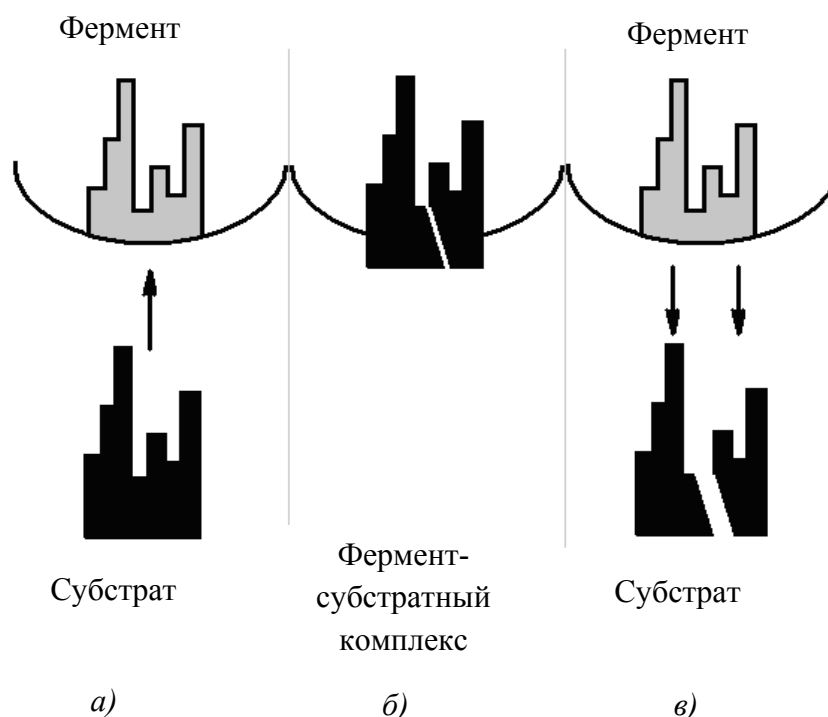
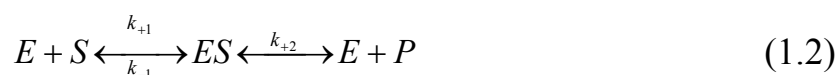


Рис. 1.4. Ферментативный гидролиз субстрата

Ферментативный гидролиз (протеолиз) полимерных цепей полипептидов и белков лежит в основе ряда биологических явлений от ограниченного протеолиза при активации ферментов [43] до глубокого гидролиза при пищеварении [11, 17]. Протеолизу принадлежит важная роль в процессах модификации пищевых белков и производстве белковых гидролизатов в пищевой промышленности. Это подробно описано в работах [21, 49, 60, 75, 92, 96, 126, 132]. Поэтому создание общей модели ферментативного процесса (включая кинетическое описание взаимодействий молекул субстрат-фермент) представляет особый интерес.

Схематично процесс ферментативного гидролиза, описанный выше, можно представить так [98]:



где  $E$  – фермент;  $S$  – субстрат;  $ES$  – фермент-субстратный комплекс;  $k_{+1}$  – константа скорости прямой реакции  $E + S \rightarrow ES$ ;  $k_{-1}$  – константа скорости обратной реакции  $ES \rightarrow E + S$ ;  $k_{+2}$  – константа скорости реакции  $ES \rightarrow E + P$ ;

Согласно теории Михаэлиса-Ментен отношение констант скоростей обратной ( $k_{-1}$ ) и прямой ( $k_{+1}$ ) реакции представляет собой константу ионного равновесия или константу диссоциации комплекса  $ES$ :

$$K_s = k_{-1}/k_{+1} \quad (1.3)$$

Если  $K_s$  велика, то велика  $k_{-1}$  и мала  $k_{+1}$ . В этом случае комплекс легко распадается на исходные вещества, реакция протекает медленно. Если  $K_s$  мала, то мала  $k_{-1}$  и ферментативная реакция идет быстро.

Исходя из закона действующих масс

$$[S]([E_0] - [ES]) = K_s[ES], \quad (1.4)$$

где  $[E_0]$  – исходная концентрация фермента в начале ферментативной реакции;  $[ES]$  – концентрация фермент-субстратного комплекса;  $[E_0] - [ES]$  – равновесная концентрация свободного фермента.

Преобразуем уравнение:

$$[ES] = [E_0][S]/(K_s + [S]). \quad (1.5)$$

Чем больше  $[ES]$ , тем больше скорость ферментативной реакции. Скорость ферментативной реакции будет максимальной при условии  $[ES] = [E_0]$ , т.е. тогда, когда фермент полностью соединится с субстратом и будет им полностью насыщен.

Следовательно,

$$V/V_{\max} = [ES]/[E_0], \quad (1.6)$$

Но

$$[ES]/[E_0] = [S]/(K_s + [S]). \quad (1.7)$$

Следовательно

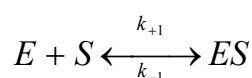
$$V/V_{\max} = [S]/(K_s + [S]) \quad (1.8)$$

или

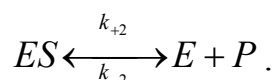
$$V = V_{\max} [S] / (K_S + [S]). \quad (1.9)$$

Уравнение (1.9) является уравнением Михаэлиса – Ментен, где  $V_{\max}$  – обозначение максимальной скорости, а  $K_S = k_{-1} / k_{+1}$  – константа равновесия реакции.

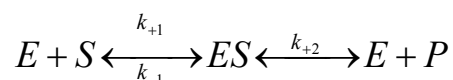
Это уравнение носит ограниченный характер, так как учитывает только первый период процесса



И не учитывает второй



Оно справедливо лишь для коротких сроков действия ферментов, когда наблюдается избыток субстрата и малый выход продукта реакции [2].



Д. Холдейн и Д. Бриггс для механизма вывели улучшенное уравнение Михаэлиса-Ментена [12]:

$$V = V \frac{[S]}{K_m + [S]}, \quad (1.10)$$

где  $K_m = k_{-1} + k_{+2} / k_{+1}$  – константа Михаэлиса.

Константа Михаэлиса является важной характеристикой фермента, которая определяет его сродство к субстрату:

$$K_m = K_S + k_{+2} / k_{+1} \quad (1.11)$$

Так как  $K_S = k_{-1} / k_{+1}$ , то  $K_m > K_S$  на величину  $k_{+2} / k_{+1}$ .

Константу Михаэлиса выражают в молях на литр (моль/л).

Физический смысл константы Михаэлиса: если  $V = 1/2V$ , то  $K_m = [S]$ .

Константа Михаэлиса равна концентрации субстрата  $[S]$ , при которой наблюдается скорость реакции, равная  $1/2$  максимальной скорости (моль/л).

Графически уравнение Михаэлиса-Ментен представляет собой гиперболу. Его можно линейризовать, используя метод двойных обратных величин (метод Лайнуивера Берка), т. е. строя зависимость  $1/V$  от  $1/[S]$ , или др. методы. Линейная форма уравнения имеет вид:

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{\max}} \cdot \left( \frac{K_m}{[S]} + 1 \right) \quad (1.12)$$

Она позволяет определить графически значения  $K_m$  и  $V_{\max}$  (рис. 1.5).

Ряд авторов предполагает, что процесс ферментативного гидролиза целесообразнее рассматривать как чисто химический процесс и использовать математический аппарат, применяемый для изучения химической кинетики [5, 42].

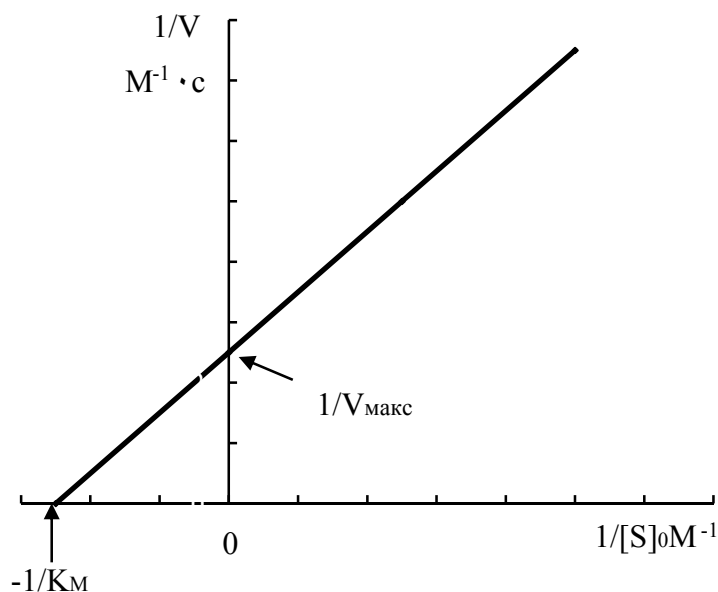


Рис. 1.5. График линейной трансформации уравнения Михаэлиса-Ментен в двойных обратных величинах (по Лайнуиверу-Берку) [12].

В ряде прикладных работ описание протеолиза сводится к получению одного алгебраического уравнения, причем входящие в него неизвестные параметры могут быть определены анализом экспериментальных кинетических кривых. Такая простота достигается путем исключения из

рассмотрения трудно учитываемых явлений и предположения, что все связи являются кинетически однородными [9].

Однако в работе [126] отмечено, что для применения формализованного математического аппарата физической химии необходимо отбрасывать биохимические детали, которые, как правило, определяют биологическую специфику процесса. В качестве примера автор обращает внимание на изучение кинетики и механизма ограниченного ферментативного гидролиза олигомерных глобулярных белков, результаты которого представлены в работе [140]. На первом этапе процесс сводился к быстрому гидролизу неупорядоченных полипептидных участков, связывающих упорядоченные домены.

Использование классической химической кинетики для описания гидролиза сложных многокомпонентных белковых смесей комплексными ферментными препаратами, включающими несколько ферментов различной субстратной специфичности, приводит, как правило, к определению кинетических констант, имеющих отрицательные значения, что свидетельствует о том, что выбранная схема реакции не имеет физического смысла [11, 42, 62].

В научной литературе также упоминается, что описать с помощью классического уравнения Михаэлиса-Ментен гидролиз рыбного белка невозможно, поскольку в гидролизуемом растворе присутствуют не только начальные и конечные продукты, но и промежуточные соединения. В этом случае в процессе гидролиза происходит конкурентное замещение исходного субстрата продуктами реакции и в этом случае константы Михаэлиса имеют отрицательные значения [21].

Также речь идет о том, что кинетические кривые протеолиза не всегда имеют прямолинейный начальный участок, и скорость гидролиза начинает снижаться с самого начала процесса [41].

По мнению ряда авторов [9], кинетика любого комплексного ферментного препарата не подчиняется уравнению Михаэлиса-Ментен.

Кинетика гидролиза яичного альбумина под действием ферментов также не подчиняется этому уравнению, что может быть связано с неполной растворимостью субстрата и ограниченным количеством связей на поверхности белка, доступных для фермента. Но в любом случае при изучении ферментативного гидролиза по накоплению желаемого продукта за определенное время реакции на кинетической кривой можно найти отрезок, в пределах которого это уравнение будет применимо.

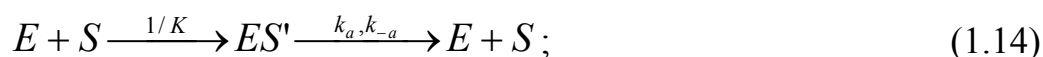
В работе [126] рассмотрено влияние молекул субстрата на процесс протеолиза. Описывается сложность процесса гидролиза белковых макромолекул в связи с их многомерностью и пространственной конформацией, затрудняющей контакт с ними активных ферментных центров. В рамках работы протеолиз рассматривается как сложный процесс, состоящий по крайней мере из непосредственно гидролиза связей, фермент-субстратного комплексообразования и освобождения связей для ферментативной атаки (демаскирование связей).

В соответствии с предложенной теорией эти процессы можно представить в виде схем:

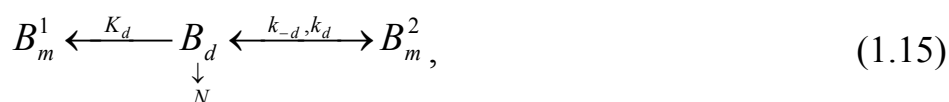
- гидролиз связей



- фермент-субстратное комплексообразование



- маскирование-демаскирование связей



где  $E$  – свободный фермент;  $B$  – пептидные связи;  $N$  – N-концевые группы;  $ES$  – фермент-субстратные комплексы, образующиеся медленно;  $ES'$  – фермент-

субстратные комплексы, образующиеся равновесно;  $B_m^1$  и  $B_m^2$  - маскированные пептидные связи по механизму внутримолекулярного и межмолекулярного маскирования  $B_d$  - демаскированные пептидные связи.

В соответствии с предложенной схемой суммарная кинетика гидролиза (при условии, что  $B_m^1 = B_m^2 = 0$ ) описывается системой, состоящей из трех дифференциальных уравнений [126]:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dN}{dt} = \frac{\langle C \rangle (S_0 - N)(E_0 - ES)}{1 + \langle 1/K(D_h) \rangle S_0}, \\ \frac{d\langle C \rangle}{dt} = -\lambda(\langle C \rangle, B, S_0, E_0), \\ \frac{dES}{dt} = -k_{-a}ES + k_a E \cdot B, \end{array} \right. \quad (1.16)$$

где  $N$  - концентрация концевых групп;  $S_0$  - начальная концентрация субстрата;  $E_0$  - начальная концентрация фермента;  $ES$  - концентрация фермент-субстратных комплексов;  $D_h$  - степень гидролиза пептидных связей;  $1 - N/S_0$ ,  $\lambda()$  — функция, определяемая моделью протеолиза;  $\langle C \rangle$  - средняя субстратная специфичность и константа Михаэлиса считаются функциями  $D_h$ ;  $k_{-a}$  и  $k_a$  - константы.

Первое уравнение описывает гидролиз пептидных связей. Второе уравнение описывает кинетику изменения усредненной величины  $\langle C \rangle$ , определяемую тем, что в первую очередь гидролизуются наиболее специфичные пептидные связи, а в последнюю очередь наименее специфичные. Третье уравнение описывает медленное комплексообразование. В ряде публикаций автора было показано, что уравнения (1.16) удовлетворительно описывают гидролиз белков и смесей пептидов химотрипсином и протосубтилином [126].

По мнению того же автора [126], определение численных значений кинетических констант протеолиза является весьма трудоемкой задачей, поэтому использование численного моделирования в протеолизе



распространено мало (предложенная в работе компьютерная программа для кинетического анализа протеолиза до недавнего времени оставалась единственной).

## **1.2. Коллоидно-химические свойства ферментативных белковых гидролизатов и области их применения**

Основными критериями для использования гидролизатов в различных областях промышленности являются их коллоидно-химические свойства (вязкость, растворимость, способность к эмульгированию, гелеобразованию, пенообразованию и т.д.). Эти свойства во многом определяются видом сырья, которое подвергается гидролизу, видом используемого для этого фермента, условиями проведения процесса ферментативного гидролиза и степенью расщепления белковых молекул [75, 155].

При гидролизе пептидных связей белковых молекул молекулярная масса полипептидных цепей уменьшается, при этом увеличивается число ионизированных групп ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{COO}^-$ ) и общий заряд макромолекулы белка, а также происходит высвобождение гидрофобной части белковой молекулы и появление остатков гидрофобных аминокислот [110, 114]. Эти изменения и приводят к изменению коллоидно-химических свойств гидролизатов в процессе ферментативного гидролиза [63].

**Растворимость.** Растворимость белковых гидролизатов зависит от способа их получения, степени гидролитического расщепления, значений pH, температуры и присутствия солей в растворе [25, 155]. Немаловажную роль также играет природа белков, подвергаемых гидролизу. Например, соевые белковые гидролизаты имеют низкую растворимость в пределах 20% в диапазоне pH 4÷5,5 [14], тогда как гидролизат мойвы имеет растворимость более 84% в диапазоне pH 2÷11 [143]. В работе [139] отмечено существенное увеличение растворимости рыбных белковых гидролизатов по сравнению с нативными белками даже при относительно низкой степени расщепления

белковых молекул. Особенно сильно эта растворимость повышается при значениях рН 4÷5, что связано не только с уменьшением молекулярной массы молекулы, но и с более сильной ионизацией amino- и карбоксильных групп и соответствующим повышением её гидрофильности. В присутствии нейтральных солей щелочных и щелочноземельных металлов растворимость белковых веществ изменяются. Характер действия этих солей зависит от их химической природы и концентрации. Так, например, повышение концентрации ионов калия приводит к повышению гидратации белковых веществ, а следовательно, к увеличению растворимости [82, 94]. Растворимость многих белковых веществ растёт с повышением температуры, но бывает и наоборот. Уменьшение растворимости связано с уменьшением гидратации вследствие повышения интенсивности теплового движения молекулы воды, удерживаемых молекулярно-силовым полем гидрофильных центров белковых молекул [82].

**Термостабильность.** В процессе сушки ферментативные белковые гидролизаты подвергаются температурным воздействиям, которые могут оказывать определенное влияние на их свойства [6, 80]. Поэтому важным качеством гидролизатов является их высокая термостабильность, то есть, способность пептидов, входящих в их состав, дольше сохранять свою структуру и свойства при воздействии температуры по сравнению с нативным белком [34, 117]. Термостабильность гидролизатов проявляется даже при небольших степенях гидролиза (3-10 %) в присутствии солей двухвалентных металлов, например  $\text{CaCl}_2$  в интервале рН от 3 до 11 при нагревании до 100÷130°C [6]. Эта закономерность характерна для гидролизатов белков молочной сыворотки, казеина, сои, а также мясных и рыбных гидролизатов.

**Эмульгирующие свойства.** Эти свойства особенно важны при получении продуктов питания. Ряд исследователей занимается изучением зависимости эмульгирующей способности гидролизатов от степени гидролиза белка [6, 16, 46, 80]. Было установлено, что эмульгирующие свойства гидролизатов улучшались при контролируемом гидролизе белка. Так, было обнаружено

значительное усиление эмульгирующей способности при гидролизе изолята соевого белка на 5 - 7 %, но при гидролизе до 9 % эмульгирующая способность уже снижалась. Подобное явление было характерно и для гидролизатов белков молочной сыворотки и казеина при использовании трипсина в качестве катализатора [151]. Более глубокий гидролиз белка молочной сыворотки, широко применяющийся для получения гипоаллергенных гидролизатов, приводит практически к полной потере эмульгирующих свойств гидролизатов, а понижение эмульгирующей способности гидролизатов во многих случаях прямо пропорционально степени гидролиза [146].

В работе [118] показано, что наличие в растворе гидролизата молочной сыворотки относительно большого количества пептидов с молекулярной массой более 2 кДа положительно влияет на стабильность эмульсии.

Также установлено [129], что при степени гидролитического расщепления 36% гидролизат сельди показывает хорошую эмульсионную способность. Увеличение эмульгирующей способности гидролизатов, по мнению исследователей, объясняется выходом на поверхность молекулы гидрофобных аминокислотных остатков, способствующих образованию устойчивых эмульсий.

Ряд авторов [16] отмечает, что при увеличении времени гидролиза минтая до 24 часов полученный гидролизат можно успешно применять для эмульгирования. В случае его использования в системе вода-масло образуются эмульсии с консистенцией жирных сливок. Устойчивость таких эмульсий составляет около 15 минут, поэтому рекомендуется при получении пищевых продуктов добавлять вспомогательные компоненты, обеспечивающие стабильность эмульсий [43, 63].

Установлено, что гидролизаты, содержащие пептиды с 20 и более аминокислотными остатками, обладают хорошей эмульгирующей способностью, а граница эмульгирующей способности для многих белков находится в области гидролизатов со средней молекулярной массой 2,4-2,5 кДа [63].

На основании исследований эмульгирующей способности гидролизатов [115, 148] выявлено, что важным фактором, влияющим на это свойство, является гидрофобность гидролизатов, поскольку именно от гидрофобности напрямую зависит растворимость белков и пептидов в воде. Так, было установлено, что при увеличении гидрофобности гидролизатов казеина их эмульгирующая способность падает. [148].

**Вязкость.** При расщеплении пептидных связей наблюдается значительное уменьшение вязкости раствора белкового гидролизата по сравнению с раствором нативных белков [116]. В работе [120] показано, что при нагревании гидролизатов сывороточных белков, в отличие от нативных белков, практически не происходит образования гелевых структур. Это объясняется существенным снижением гидрофобности гидролизатов, а также увеличением степени их ионизации по сравнению с нативными сывороточными белками [63].

В работе [37] отмечено, что при ферментативном гидролизе 5 %-го раствора желатины уменьшение характеристической вязкости раствора гидролизата наблюдается уже через 10 минут после начала гидролиза. Через 19 часов этот показатель уменьшается более чем в 2 раза по сравнению с начальным моментом времени. При этом молекулярная масса белковых веществ в исследуемом растворе также уменьшалась почти в 2 раза при увеличении времени гидролиза с 4 до 19 часов.

Подобное уменьшение вязкости является положительным фактором при создании пищевых продуктов с высоким содержанием азотистых компонентов, так как существенно облегчает их транспортировку при дальнейшей технологической обработке. Кроме того, уменьшение вязкости гидролизатов положительно влияет на процесс сушки, так как позволяет существенно увеличить концентрацию азотистых компонентов в растворе, предназначенном для удаления влаги [63].

Следовательно, белковые гидролизаты со средней степенью гидролиза можно с успехом добавлять ко многим пищевым продуктам для

совершенствования технологии изготовления и получения продуктов с высоким содержанием пищевого азота [117].

### *Области применения белковых гидролизатов*

Традиционными областями применения белковых гидролизатов в зависимости от степени расщепления белка и степени очистки являются медицинская, пищевая, комбикормовая и микробиологическая промышленности.

В медицине белковые гидролизаты применяются для производства лекарственных препаратов [125], при различных патологиях, сопровождающихся нарушением пищеварения, а также при пищевых аллергиях. В этих случаях решающее значение приобретает лечебное питание [15, 23]. Питательные бульоны, приготовленные на основе рыбных белковых гидролизатов, предназначены для профилактики белковой недостаточности, заболеваний костно-мышечной системы и соединительной ткани, а также для улучшения обмена веществ в организме [19, 71].

В лечебном питании питательные вещества вводят либо в пищеварительную систему, либо непосредственно в кровь. Во всех этих случаях белок должен быть предварительно гидролизован, причем степень гидролиза зависит как от патологии организма, так и от выбранного способа введения [39, 76, 95].

Также продукты ферментативного гидролиза рыбного сырья могут быть использованы при производстве мучных кондитерских изделий профилактического назначения. Это повышает биологическую ценность выпускаемой продукции и является одним из направлений решения проблемы здорового питания населения [145].

Известно, что отдельные белки, такие, как белки молока, яиц, молочной сыворотки и сои могут вызывать аллергические реакции. Причем, даже очень незначительное содержание таких белков в пищевых продуктах оказывает аллергическое действие. В этом случае белки могут быть заменены на

соответствующие белковые гидролизаты [141]. Например, гипоаллергенные гидролизаты молочных белков используют в специализированном (для спортсменов), клиническом и детском питании [141, 143]. Содержание в рыбном гидролизате фосфора и кальция особенно важно для детского организма и женщин в период беременности и лактации [36].

Рыбный коллаген, богатый глицином и пролином, а также редко встречающимися гидроксипролином и гидроксизином, также является гипоаллергенным, т. к. на 96 % идентичен человеческому белку [63, 110]. Коллаген и продукты его гидролиза используются при производстве желатина, для осветления вин, получения пищевых плёнок, покрытий, съедобных оболочек, в качестве структурообразующего агента [104] в заливках для консервов и рыбных фаршей, формованных рыбных изделий, при производстве искусственной икры, бульонов, студней, соусов, различных оздоровительных напитков и коктейлей или как добавки в хлебопекарном и кондитерском производствах [93].

В пищевой промышленности белковые гидролизаты используют для приготовления соусов, приправ, бульонов или высококалорийных пищевых добавок [18, 19, 93, 104, 149].

Гидролиз белков широко применяют и для улучшения качества мясных продуктов [81]. Гидролиз соединительной ткани ферментными препаратами, обладающими коллагеназной активностью, значительно улучшает качество мясных полуфабрикатов. Кроме того, для повышения питательной ценности мясных полуфабрикатов в них могут быть введены белковые гидролизаты с полноценным аминокислотным составом, в результате чего удастся получить мясные продукты, которые по своей эффективности близки к эталонным белкам [72, 99].

Полипептидная фракция, содержащая от 5 до 50 остатков аминокислот, полученная ферментативным гидролизом казеина, была использована в качестве эмульгатора, а кислые гидролизаты казеина - в качестве влагосвязывающих веществ для отдельных видов пищевых продуктов, например

рыбных консервов [63]. Показана возможность для использования методов ферментативного гидролиза для восстановления органолептических свойств сублимированного мяса [83]. Апробация такого мяса в составе фаршей, рубленых полуфабрикатов показала, что готовые продукты обладают выраженной сочностью, хорошим вкусом и запахом и имеют высокую перевариваемость. Широкое использование получили белковые гидролизаты и в качестве основы для различных ароматизаторов и вкусовых добавок, имитирующих запах и вкус мяса, рыбы и грибов. В качестве субстратов для получения таких ароматизаторов могут быть использованы белки животного, растительного и микробного происхождения, белковые отходы пищевой промышленности.

Одной из распространенных областей применения белковых гидролизатов в пищевой промышленности является получение натуральных колбасных оболочек. В этом случае используют бактериальные ферменты, обладающие низкой коллагеназной активностью [93]. Отходы мясной промышленности, содержащие коллаген, подвергают действию подобных ферментов, и из оставшегося негидролизованного коллагена после его механической или химической обработки получают колбасные оболочки. Как показывают исследования, качество колбасных изделий в натуральной белковой оболочке значительно выше, чем качество аналогичных изделий в целлофане [33, 83].

В комбикормовой промышленности белковые гидролизаты применяются для получения комбинированных кормов. Высокое содержание полноценных белков определяет их особое место в создании кормовой базы животноводства [96, 102]. Так гидролизат, полученный ферментативным способом из рыбы, был использован в качестве белковой добавки и стимулятора роста в корм сельскохозяйственных животных и птиц, а также молоди рыб в условиях искусственного выращивания. Многочисленные исследования по разработке технологии получения таких ферментативных гидролизатов и использованию их в качестве кормовых добавок были проведены в лаборатории биохимии и технологии гидробионтов Полярного научно-исследовательского института

морского рыбного хозяйства и океанографии им. Н.М. Книповича (г. Мурманск) [60, 88].

Введение в стартовые корма ферментативного белкового гидролизата оказывает положительное воздействие на выживаемость молоди семги *Salmo salar*. Замена 20-ти % рыбной муки гидролизатом отходов промысла исландского гребешка в стартовом корме позволяет увеличить выживаемость мальков в возрасте 30-100 дней более чем на 50 %. Использование гидролизатов в качестве кормовой добавки цыплят-бройлеров позволило увеличить прирост их массы на 15 % за 47 дней [60].

В микробиологической промышленности в настоящее время для приготовления белковых гидролизатов, служащих основой для диагностических питательных сред, используются различные виды сырья: ценное пищевое сырье (мясо, рыба, казеин); непищевое сырье (кормовые дрожжи) и белковые промышленные отходы (отдельные органы сельскохозяйственных животных, мясные отходы производства вакцин, рыбная кормовая мука, а также отходы рыбы и морепродуктов и др.) [7, 15]. Полноценной основой питательных сред для выращивания широкого круга патогенных и непатогенных микроорганизмов могут служить продукты гидролиза коллагена и гидролизаты белково-витаминных концентратов [110].

Питательные среды на основе рыбных гидролизатов, имеющие полноценный аминокислотный состав, находят широкое применение как субстраты для роста культур клеток [7, 10, 70, 96]. Такие питательные среды используются для выявления патогенной микрофлоры (кишечной палочки, сальмонеллы, листерии) [32, 69, 89], а также для получения различных бактериальных препаратов, например, препарата «Родер», применяемого для очистки почв и природных вод от нефти и нефтепродуктов [84].

Помимо вышперечисленных направлений, в зависимости от степени очистки белковые гидролизаты нашли широкое применение в косметологии для получения различных шампуней, лаков для волос и других косметических и парфюмерных средств [23, 55, 85].



Приведенный обзор литературных данных показал, что коллоидно-химические свойства гидролизатов определяются, прежде всего, выбранным для гидролиза исходным субстратом, аминокислотным составом последнего, способом и степенью расщепления белковых молекул и последующей очисткой гидролизата. На глубину ферментативной реакции главным образом влияет природа фермента.

В последнее время предпринимаются попытки компьютерного моделирования процесса протеолиза, в том числе и многостадийного. Однако рассмотренные публикации позволяют сделать вывод, что процесс ферментативного гидролиза сложен и во многом специфичен, поэтому трудно построить его физико-химическую модель, в которой были бы учтены все факторы, влияющие на данный процесс. Установление детального механизма ферментативного гидролиза белоксодержащих веществ остается проблемой до конца не решенной.

## Глава 2. Объекты исследования

Объектами исследования являются белоксодержащее рыбное сырье (отходы рыбопереработки), ферментный препарат и полученные из рыбного сырья ферментативные белковые гидролизаты.

### 2.1. Белоксодержащее сырье

В качестве сырья для получения белковых гидролизатов использовали отходы переработки атлантической трески (*Gadus morhua morhua*) и золотистого морского окуня (*Sebastes marinus*). Эти виды рыб являются промысловыми и содержат большое количество белка.

1. Атлантическая треска - традиционный объект промысла в Баренцевом море и сопредельных водах. Лов трески исторически ведут такие страны как Россия, Норвегия, Великобритания, Германия, Франция, Польша, Исландия, Испания и др. Благодаря широкому ареалу распространения, массовости и доступности для вылова технохимический состав этого вида рыб хорошо изучен [30].

Характеризуя ценность рыб семейства тресковых, следует отметить, что при относительно небольшой калорийности (60-90 калорий на 100 г), среднее содержание белка в тканях атлантической трески колеблется в пределах 16-18 % [93, 101]. Компонентный состав тканей (таблица 2.1) характеризуется низким содержанием жира (менее 1 %).

Известно, что биологическая ценность белка определяется, главным образом, содержанием в нем незаменимых аминокислот, т.е. не синтезируемых в организме, а получаемых исключительно с пищей. Аминокислотный состав белков во многом определяет аминокислотную полноценность гидролизата. Ткани трески богаты аланином, лизином, лейцином, а также глутаминовой и аспарагиновой кислотой [93].

Аминокислотный состав белков тканей трески представлен в таблице 2.2.

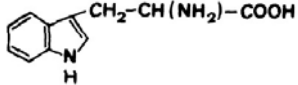
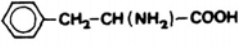
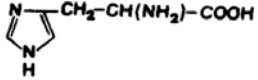
Таблица 2.1

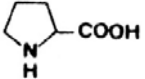
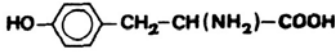
Содержание (%) компонентов мышечных тканях атлантической трески

Компонент	Литературные данные [101]	Экспериментальные данные (по ГОСТ 7631-85)
Вода	81,2 ± 0,9	77,1 ± 0,7
Белок	17,4 ± 1,4	15,9 ± 0,9
Жир	0,2 ± 0,2	0,8 ± 0,5
Зола	1,2 ± 0,3	5,0 ± 1,2

Таблица 2.2

Аминокислотный состав белков мышечных тканей атлантической трески  
[101]

Аминокислота	Обозначение	Структурная формула	ω, %
Валин	Val	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\   \\ \text{CH} - \text{CH}(\text{NH}_2) - \text{COOH} \\   \\ \text{H}_3\text{C} \end{array}$	5,9
Изолейцин	Ile	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} - \text{CH}_2 \\   \\ \text{CH} - \text{CH}(\text{NH}_2) - \text{COOH} \\   \\ \text{H}_3\text{C} \end{array}$	4,2
Лейцин	Leu	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\   \\ \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{CH}(\text{NH}_2) - \text{COOH} \\   \\ \text{H}_3\text{C} \end{array}$	8,8
Лизин	Lys	$\text{H}_2\text{N} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}(\text{NH}_2) - \text{COOH}$	8,1
Метионин	Met	$\text{H}_3\text{C} - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}(\text{NH}_2) - \text{COOH}$	2,6
Треонин	Thr	$\text{H}_3\text{C} - \text{CHOH} - \text{CH}(\text{NH}_2) - \text{COOH}$	6,0
Триптофан	Trp		1,0
Фенилаланин	Phe		3,9
Аланин	Ala	$\text{CH}_3 - \text{CH}(\text{NH}_2) - \text{COOH}$	8,6
Аргинин	Arg	$\begin{array}{c} \text{HN} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}(\text{NH}_2) - \text{COOH} \\    \\ \text{C} \\ / \quad \backslash \\ \text{HN} \quad \text{NH}_2 \end{array}$	3,3
Аспарагиновая	Asp	$\text{HOOC} - \text{CH}_2 - \text{CH}(\text{NH}_2) - \text{COOH}$	9,0
Гистидин	His		2,0
Глицин	Gly	$\text{H}_2\text{N} - \text{CH}_2 - \text{COOH}$	8,6
Глутаминовая	Glu	$\text{HOOC} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}(\text{NH}_2) - \text{COOH}$	14,4

Пролин	Pro		3,2
Серин	Ser	$\text{HOH}_2\text{C}-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	6,1
Тирозин	Tyr		3,1
Цистеин	Cys	$\text{HSH}_2\text{C}-\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	1,2

В таблице 2.3 представлено содержание микроэлементов в тканях трески. Экспериментальные данные получены методом атомно-абсорбционной спектроскопии.

Таблица 2.3

Содержание (мкг/г сухого вещества) микроэлементов в мышечных тканях трески

Микро-элемент	Экспериментальные данные	Литературные данные [101]	Литературные данные [47]	ПДК [148]
Ni	5,00	0,4 - 1,6	0,3 - 0,38	-
Cr	1,74	<0,5	0,4 - 0,46	-
Co	1,77	<0,5	0,16 - 0,26	-
Cu	2,25	2,3-8,3	0,33 - 0,47	10,0
Mn	4,22	0,8 - 1,8	0,32 - 0,38	-
Cd	0,01	<0,05	0,01- 0,012	0,2
Fe	0,07	17,2 - 33,4	4,0 - 5,2	-
Zn	0,04	26,1 - 37,9	3,31 - 3,37	40,0

2. Северная путассу (*Micromesistius poutassou*) распространена у берегов Европы и по всей акватории Норвежского моря. Заходит в Баренцево и Гренландское моря.

Химический состав мяса путассу аналогичен таковому для тресковых (таблица 2.4). Мясо содержит около 18% белка. Химический состав и хорошие органолептические показатели позволяют использовать ее для производства продукции холодного и горячего копчения, а также консервов в томатной заливке. Печень путассу может быть использована для получения рыбьего жира [101].

Аминокислотный состав белков мышечных тканей северной путассу представлен в таблице 2.5.


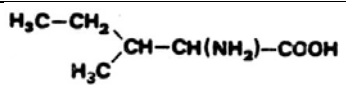
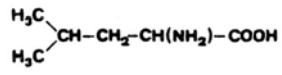
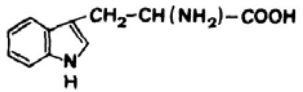
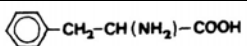
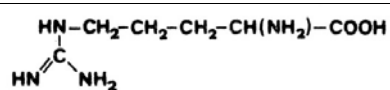
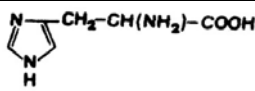
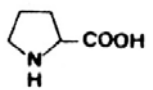
Таблица 2.4

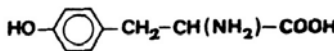
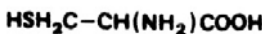
Содержание (%) компонентов в мышечных тканях путассу, [101]

Вода	Белок	Жир	Зола
80,2 ± 2,1	18,1 ± 2,3	0,3 ± 0,2	1,4 ± 0,2

Таблица 2.5

Аминокислотный состав белков мышечных тканей северной путассу [101]

Аминокислота	Обозначение	Структурная формула	ω, %
Валин	Val		5,5
Изолейцин	Ile		5,2
Лейцин	Leu		8,0
Лизин	Lys	$H_2N-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH(NH_2)-COOH$	9,0
Метионин	Met	$H_3C-S-CH_2-CH_2-CH(NH_2)-COOH$	3,1
Треонин	Thr	$H_3C-CHOH-CH(NH_2)-COOH$	5,2
Триптофан	Trp		1,2
Фенилаланин	Phe		4,1
Аланин	Ala	$CH_3-CH(NH_2)-COOH$	6,5
Аргинин	Arg		5,8
Аспарагиновая	Asp	$HOOC-CH_2-CH(NH_2)-COOH$	9,0
Гистидин	His		3,9
Глицин	Gly	$H_2N-CH_2-COOH$	9,6
Глутаминовая	Glu	$HOOC-CH_2-CH_2-CH(NH_2)-COOH$	13,1
Пролин	Pro		5,2
Серин	Ser	$HOH_2C-CH(NH_2)-COOH$	4,1

Тирозин	Tyr		2,4
Цистеин	Cys		1,1

3. Золотистый морской окунь распространен в Баренцевом море и Северной Атлантике, многочислен у берегов Норвегии, известен у берегов Шотландии, Ирландии, Испании и Гренландии.

Золотистый окунь характеризуется высоким содержанием белка (от 17,7 до 20,8 %). Доля жира в среднем составляет 5,6 %, наибольшее его накопление в мясе отмечается у старших возрастных групп. Химический состав золотистого морского окуня представлен в таблице 2.6.

Таблица 2.6

Содержание (%) компонентов в мышечных тканях золотистого морского окуня [101]

Вода	Белок	Жир	Зола
73,6 ± 3,9	19,2 ± 0,4	5,6 ± 3,4	1,3 ± 0,2

4. В качестве модельного белка в работе использовали рыбную желатину, произведенную из чешуи пресноводных прудовых рыб (в частности карпа, толстолобика, белого амура и карася) на базе Астраханского государственного технического университета [86].

Химический состав желатины представлен в таблице 2.7.

Таблица 2.7

Содержание (%) компонентов в желатине, произведенной из чешуи пресноводных прудовых рыб [3]

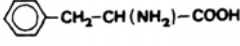
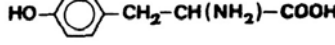
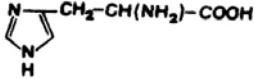
Вода	Белок	Жир	Зола
13,7 ± 0,4	84,6 ± 0,5	0,2 ± 0,1	1,7 ± 0,5

Аминокислотный состав желатины включает 18 аминокислот, в том числе глицин, пролин, гидроксипролин, аланин, аргинин, глутаминовую и

аспарагиновую кислоты [48]. Полный аминокислотный состав желатины представлен в таблице 2.8.

Таблица 2.8

## Аминокислотный состав рыбной желатины [138]

Аминокислота	Обозначение	Структурная формула	ω, %
Глицин	Gly	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{COOH}$	31,7
Аланин	Ala	$\text{CH}_3-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	12,0
Валин	Val	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\   \\ \text{CH}-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH} \\   \\ \text{H}_3\text{C} \end{array}$	1,9
Изолейцин	Ile	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2 \\   \\ \text{CH}-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH} \\   \\ \text{H}_3\text{C} \end{array}$	1,2
Лейцин	Leu	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\   \\ \text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH} \\   \\ \text{H}_3\text{C} \end{array}$	2,5
Пролин	Pro		12,4
Фенилаланин	Phe		1,4
Тирозин	Tyr		0,3
Серин	Ser	$\text{HOH}_2\text{C}-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	4,3
Метионин	Met	$\text{H}_3\text{C}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	1,2
Цистеин	Cys	$\text{HSH}_2\text{C}-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	0,1
Лизин	Lys	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	0,3
Гистидин	His		0,5
Аргинин	Arg	$\begin{array}{c} \text{HN}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH} \\   \\ \text{C} \\ / \quad \backslash \\ \text{HN} \quad \text{NH}_2 \end{array}$	5,3
Аспарагиновая	Asp	$\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	4,7
Глутаминовая	Glu	$\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	7,4

## 2.2. Ферментный препарат

В качестве основного ферментного препарата в работе использовали гепатопанкреатин - комплекс протеиназ из гепатопанкреаса камчатского краба (*Paralithodes Camtschaticus*), полученный в лаборатории биохимии и технологии Полярного научно-исследовательского института морского

рыбного хозяйства и океанографии им. Н.М. Книповича (ТИ 9280-026-00472182-04) [59].

Ферментный препарат представляет собой однородный пылеобразный порошок бежевого цвета, не содержит влажных плотных комков, хорошо растворим в воде. Данный препарат характеризуется низким содержанием жира (менее 1 %) и содержит более 90 % белка. Проявляет активность в нейтральной среде по отношению к различным белковым субстратам: казеинату натрия (700 Е/мг), гемоглобину (100 Е/мг) и коллагену (120 Е/мг). Общая протеолитическая и, в частности, коллагеназная активность гепатопанкреатина значительно выше, чем активность ферментов в пищеварительных органах позвоночных животных.

Оптimum действия данного ферментного препарата наблюдается при температуре 50 – 55 °С, и в диапазоне рН 7-9.

При оценке эффективности действия полученного ферментного препарата на различные белковые продукты обнаружено, что наиболее высокая его протеолитическая способность проявляется по отношению к тканям исландского гребешка и северной креветки, которые входят в пищевой рацион камчатского краба. В меньшей степени ферментный препарат расщепляет белки животного происхождения (мясо курицы, говядину, свинину и др.) [60].

Химический состав ферментного препарата гепатопанкреатина представлен в таблице 2.9.

Таблица 2.9

Содержание (%) компонентов в ферментном препарате [59]

Вода	Белок	Жир	Зола
8,5 ± 0,4	90,0 ± 0,7	0,7 ± 0,5	0,8 ± 0,2

В таблице 2.10 представлено содержание микроэлементов в ферментном препарате. Экспериментальные данные получены в данной диссертационной работе методом атомно-абсорбционной спектроскопии.



Гепатопанкреатин характеризуется повышенным содержанием меди. Это связано с тем, что у ракообразных в состав красящих веществ крови входит не железо, а медь [45].

Таблица 2.10

Содержание микроэлементов (мкг/г сухого вещества) в ферментном препарате

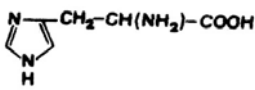
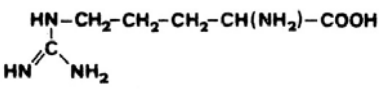
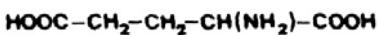
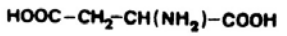
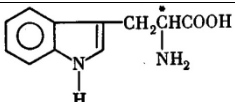
Микроэлемент	Ni	Cr	Co	Cu	Mn	Cd	Fe	Zn
С, мкг/г сухого вещества	2,25	2,24	1,34	50	4,70	0,05	0,18	0,06

Аминокислотный состав гепатопанкреатина характеризуется высоким содержанием аспарагиновой, глутаминовой кислот, а также триптофана и серина. Полный аминокислотный состав представлен в таблице 2.11.

Таблица 2.11

Аминокислотный состав гепатопанкреатина

Аминокислота	Обозначение	Структурная формула	$\omega$ , %
Глицин	Gly	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{COOH}$	5,58
Аланин	Ala	$\text{CH}_3-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	5,10
Валин	Val	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\   \\ \text{CH}-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH} \\   \\ \text{H}_3\text{C} \end{array}$	6,11
Изолейцин	Ile	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2 \\   \\ \text{CH}-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH} \\   \\ \text{H}_3\text{C} \end{array}$	4,97
Лейцин	Leu	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\   \\ \text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH} \\   \\ \text{H}_3\text{C} \end{array}$	6,67
Пролин	Pro		12,4
Фенилаланин	Phe		4,32
Тирозин	Tyr		4,14
Серин	Ser	$\text{HOH}_2\text{C}-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	8,89
Метионин	Met	$\text{H}_3\text{C}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	1,42
Лизин	Lys	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	4,53

Гистидин	His		2,31
Аргинин	Arg		2,31
Глутамин	Glu		13,72
Аспарагиновая	Asp		13,93
Триптофан	Trp		9,05

Для изучения влияния типа ферментного препарата на процесс ферментативного гидролиза в работе использовали ферментный препарат, выделенный из пищеварительных органов краба-стригуна (*Chionoecetes opilio*) в лаборатории биохимии и технологии Полярного научно-исследовательского института морского рыбного хозяйства и океанографии им. Н.М. Книповича (ТИ 9280-026-00472182-04).

Содержание (%) компонентов в тканях внутренних органов краба-стригуна представлено в таблице 2.12.

Таблица 2.12

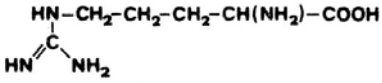
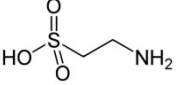
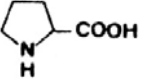
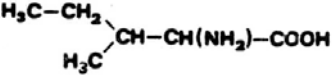
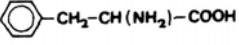
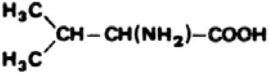
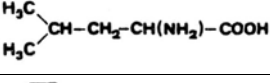
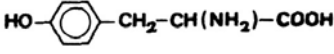
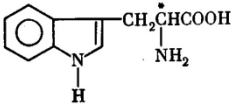
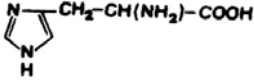
Содержание (%) компонентов в тканях внутренних органов краба-стригуна [67]

Вода	Белок	Жир	Зола
80,9 ± 1,3	16,4 ± 1,2	0,5 ± 0,1	1,5 ± 0,4

Особенностью аминокислотного состава тканей крабов-стригунов является высокое содержание таурина, глутамина, глицина, аланина, аргинина и пролина, сумма которых составляет 85,8% от общей суммы свободных аминокислот. Преобладающей аминокислотой является глицин [136].

Аминокислотный состав тканей внутренних органов краба-стригуна представлен в таблице 2.13.

Аминокислотный состав белков тканей внутренних органов краба-стригуна [136]

Аминокислота	Обозначение	Структурная формула	ω, %
Глицин	Gly	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{COOH}$	27,4
Аргинин	Arg	$\text{HN}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$ 	23,6
Аланин	Ala	$\text{CH}_3-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	11,2
Таурин	Taurine		10,7
Лизин	Lys	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	4,4
Пролин	Pro		3,9
Глутамин	Glu	$\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	1,8
Изолейцин	Ile	$\text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{H}_3\text{C})-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$ 	1,4
Фенилаланин	Phe		1,3
Серин	Ser	$\text{HOH}_2\text{C}-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	1,1
Валин	Val	$\text{H}_3\text{C}-\text{CH}(\text{H}_3\text{C})-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$ 	1,1
Лейцин	Leu	$\text{H}_3\text{C}-\text{CH}(\text{H}_3\text{C})-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$ 	1,1
Тирозин	Tyr	$\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$ 	1,0
Метионин	Met	$\text{H}_3\text{C}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	0,9
Триптофан	Trp		0,8
Гистидин	His		0,4
Аспарагиновая	Asp	$\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	0,2

### 2.3. Ферментативный белковый гидролизат

В работе изучали ферментативные белковые гидролизаты, которые были получены двумя способами:

1. традиционным способом, разработанным в лаборатории биохимии и технологии Полярного научно-исследовательского института морского рыбного хозяйства и океанографии им. Н.М. Книповича [87];

2. модифицированным способом, разработанным в представленной диссертационной работе.

Получение ферментативного белкового гидролизата традиционным способом включает в себя несколько стадий (рис. 2.1):

1. Размораживание сырья проводили при  $T = 12 \text{ }^{\circ}\text{C} (\pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C})$ .

2. Измельчение сырья проводили на гомогенизаторе 1094 “ТЕСАТОР” (Швеция). Диаметр частиц измельченного сырья должен быть не более 3 мм. Измельченное сырье направляли в реактор для ферментативного гидролиза.

3. Ферментативный гидролиз. В аппарат из щелоче- и кислотостойкого материала с перемешивающим устройством загружали воду и измельченное сырье (соотношение воды и сырья 1:1). Смесь тщательно перемешивали, нагревали на водяной бане до  $T = 50 \text{ }^{\circ}\text{C} (\pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C})$ . В реакционную смесь однократно вносили ферментный препарат гепатопанкреатин (концентрация ферментного препарата  $C_{\text{фп}} = 1 \div 7 \text{ г/кг}$  сырья).

Процесс ферментативного гидролиза проводили, поддерживая температуру  $T = 50 \text{ }^{\circ}\text{C} (\pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C})$  при постоянном перемешивании.

4. Для инактивации фермента после окончания процесса ферментативного гидролиза реакционную смесь нагревали до  $T = 95 \text{ }^{\circ}\text{C} (\pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C})$  и выдерживали при этой температуре и постоянном перемешивании в течение 15 минут.

5. Центрифугирование смеси проводили на центрифуге AVANTI J-25 “БЕСКМАН” (Швейцария). Нерастворимую часть отправляли на дальнейшую переработку. Верхнюю липидную фракцию направляли на утилизацию. Надосадочную жидкость собирали в аппарат из щелочестойкого материала и направляли на обезжиривание и осветление.



Рис. 2.1. Схема традиционного способа получения ферментативного белкового гидролизата

6. Обезжиривание и осветление. В аппарат из щелоче- и кислотостойкого материала с перемешивающим устройством загружали гидролизат. Добавляли при перемешивании 18 %-ный раствор соляной кислоты до значения рН смеси, равного  $(6,2 \pm 0,2)$ . Затем в нейтрализованную смесь добавляли при

перемешивании 1 %-ный раствор хитозана в 0,1 моль/л растворе соляной кислоты (соотношение массы сырья и раствора хитозана 1:0,1). Полученную смесь перемешивали в течение 15-20 минут. Затем для осаждения хитозана добавляли 20 %-ный раствор гидроксида натрия, доведя рН смеси до значения  $(8,2 \pm 0,2)$ . Полученную смесь перемешивали в течение 15 минут. Не выключая перемешивающее устройство, образовавшуюся суспензию направляли на центрифугирование для отделения образовавшегося осадка.

7. Центрифугирование. Процедура аналогична п. 5.

8. Нейтрализация. В аппарат из щелочестойкого материала с перемешивающим устройством загружали очищенный гидролизат после центрифугирования. При перемешивании добавляли 18 %-ный раствор соляной кислоты до значения рН фильтрата, равного  $(7,2 \pm 0,2)$ . Нейтрализованный раствор гидролизата направляли на фильтрование.

9. Фильтрование. Фильтрование проводили через слой фильтрующего материала (несколько слоев фильтровальной бумаги). Прозрачный очищенный гидролизат собирали в емкость из щелочестойкого материала и направляли на сушку.

10. Сушка. Гидролизат сушили в леофильной сушилке под вакуумом при температуре  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

11. Измельчение. Высушенный гидролизат измельчали на дробилке до размера частиц не более 0,2 мм.

Полученный гидролизат представляет собой однородный мелкодисперсный порошок светло-бежевого цвета, хорошо растворимый в воде.

Усовершенствование традиционной технологической схемы предполагает многократное внесение ферментного препарата в реакционную смесь. Предлагается вносить гепатопанкреатин каждые 30 минут в течение первых трех часов гидролиза. Концентрация ферментного препарата  $C_{\text{фп}} 1 \div 6$  г/кг сырья.

Это изменение позволит интенсифицировать процесс ферментативного гидролиза.

В работе исследовали кинетические закономерности процесса ферментативного гидролиза при однократном и многократном внесении ферментного препарата и проводили химический анализ гидролизатов, полученных по традиционной и усовершенствованной (модифицированной) технологии. Для этого пробы гидролизатов отбирали в одноразовые центрифужные пробирки каждые 5 минут в течение первых 30 минут, затем каждые 10 минут до истечения 3 часов и затем каждые 30 минут. Каждую пробу кипятили для инактивации ферментного препарата и центрифугировали для отделения надосадочной жидкости. Проводили очистку и сушку рыбного гидролизата в соответствии с п. 6-10 технологической схемы.

## **Глава 3. Методы исследования**

### **3.1. Определение компонентного состава сырья**

Для оценки качества сырья, ферментного препарата и полученных рыбных гидролизатов определяли их компонентный состав: содержание воды, жира, белков и сухого остатка.

Отбор проб проводили по ГОСТ 7631-85 «Рыба, морские млекопитающие, морские беспозвоночные и продукты их переработки. Правила приемки, органолептические методы оценки качества, методы отбора проб для лабораторных испытаний» и по ГОСТ 13496.0 - 80 «Комбикорма, сырье. Методы отбора проб для кормовой муки из рыбы, морских млекопитающих и ракообразных». Химический анализ средней пробы проводили по ГОСТ 7636 - 85 «Рыба, морские млекопитающие, морские беспозвоночные и продукты их переработки. Методы анализа».

### **3.2. Определение протеиназной активности ферментных препаратов**

Метод основан на определении оптической плотности раствора гидролизата, полученного при действии ферментного препарата на 1%-ный раствор казеината натрия [2].

В две пробирки вносили по 2 мл 1 %-го раствора казеината натрия, термостатировали при температуре 37 °С в течение 5 мин. Добавляли в 1-ю пробирку (контроль) 3,6 мл дистиллированной воды, во 2-ю (проба) – 3,6 мл воды и 0,4 мл раствора ферментного препарата ( $C_{\text{фп}} = 1$  мг/мл). Содержимое пробирок перемешивали и выдерживали при температуре 37 °С в течение 10 мин. Затем в обе пробирки добавляли по 2 мл 10 %-го раствора трихлоруксусной кислоты для осаждения белков с высокой молекулярной массой. В контрольную пробирку добавляли 0,4 мл раствора ферментного препарата ( $C_{\text{фп}} = 1$  мг/мл) для вычитания оптического поглощения ферментного препарата. Обе пробирки выдерживали в течение 10 мин при комнатной температуре, затем их содержимое фильтровали через бумажные фильтры.



Измеряли оптическую плотность ( $D$ ) растворов при длине волн 280 и 320 нм. Рассчитывали значение протеиназной активности ( $A$ , мкмольТYR/г) по формуле:

$$A = \frac{(D_{\text{проба}} - D_{\text{контроль}}) \times V_{\text{общ}} \times 10^6}{C_{\text{фп}} \times V_{\text{фп}} \times \varepsilon_{\text{Tyr}} \times l} \quad (3.1)$$

где  $D_{\text{проба}}$  – разность оптических плотностей раствора пробы, измеренных при длине волн  $\lambda = 280; 320$  нм;

$D_{\text{контроль}}$  - разность оптических плотностей контрольного раствора, измеренных при длине волн  $\lambda = 280; 320$  нм;

$V_{\text{общ}}$  - объем пробы после добавления трихлоруксусной кислоты, мл;

$C_{\text{фп}}$  - концентрация ферментного препарата, мг/мл;

$V_{\text{фп}}$  - объем раствора ферментного препарата, мл;

$\varepsilon_{\text{Tyr}}$  - молярная экстинкция тирозина, л/(моль · см), ( $\varepsilon_{\text{Tyr}}=1171,6$  л/(моль · см));

$l$  - длина оптического пути кюветы, см;

$10^6$  - пересчет моль тирозина в мкмоль.

### 3.3. Определение степени гидролиза

Метод определения степени гидролиза (СГ), т.е. степени гидролитического расщепления белковых веществ молекулами фермента, основан на вычислении соотношения значений аминного и общего азота, из которых предварительно вычитаются фоновые значения аминного азота (азот свободных аминокислот, содержащихся в негидролизованном сырье)

$$\tilde{N}\tilde{A} = \left[ \frac{N_{\dot{a}\dot{a}} - N_{\dot{a}\dot{a}0}}{N_{\dot{a}\dot{a}} - N_{\dot{a}\dot{a}0}} \right] \cdot 100\% , \quad (3.2)$$

где  $N_{\dot{a}\dot{a}}$  - массовая доля аминного азота в растворе гидролизата, %;

$N_{\dot{a}\dot{a}0}$  - массовая доля аминного азота в негидролизованном сырье (фон), %;

$N_{\text{общ}}$  - массовая доля общего азота, %.

Массовую долю аминного азота определяли методом формольного титрования по ГОСТ 7636-85. Метод основан на связывании аминогрупп с формалином и косвенном определении их количества по результатам титрования карбоксильных групп.

Массовую долю общего азота определяли с помощью макрометода по ГОСТ 7636-85. Метод заключается в определении азота по Кьельдалю с последующим пересчетом на белок. Сущность метода состоит в разложении органического вещества пробы кипящей концентрированной серной кислотой с образованием солей аммония, переводе их в аммиак, отгонки аммиака паром в раствор серной кислоты, количественном определении аммиака методом обратного титрования.

Пересчет массовых долей аминного и общего азота в концентрации (г/л) осуществляли по формулам:

$$C_{aa} = N_{aa} \cdot 10 \cdot \rho \quad (3.3)$$

$$C_{aa0} = N_{aa0} \cdot 10 \cdot \rho \quad (3.4)$$

$$C_{общ} = N_{общ} \cdot 10 \cdot \rho \quad (3.5)$$

где  $\rho$  – плотность растворов гидролизатов, г/мл.

### 3.4. Метод ПААГ-электрофореза

Для определения молекулярно-массового состава гидролизатов использовали метод горизонтального электрофореза в градиентном полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ПААГ-электрофорез). Этот метод основан на миграции белковых макромолекул в полиакриламидном геле под действием электрического поля, что позволяет разделять белки в широком диапазоне молекулярных масс [66, 155].

#### *Полиакриламидный гель*

В порах полиакриламидного геля, действующего как молекулярное сито, большие белки тормозятся значительно сильнее, чем малые белки. Вследствие

этого белки, обладающие высокой молекулярной массой остаются в начале гелевой пластинки, тогда как низкомолекулярные белки мигрируют в ней от отрицательного электрода к положительному. Таким образом, сложная смесь белков делится на ряд фракций, которые при окрашивании гелевой пластинки проявляются на ней как ряд полос, расположенных в соответствии с их молекулярной массой.

Наличие у гелевой пластинки градиента пористости способствует лучшему разделению смеси исследуемых белков в процессе электрофореза. Градиентом пористости называется плавный переход геля на пластинке из крупнопористого в мелкопористый. Для формирования градиента при заливке на пластинку смешивают два раствора геля, с разным содержанием мономера акриламида. Путем увеличения концентрации акриламида в растворе геля достигается постепенное уменьшение среднего размера пор вдоль градиента. В работе разделение белков производили в полиакриламидном геле с градиентом пористости 8-18 % (т.е. при заливке данного геля были использованы растворы с содержанием акриламида соответственно 8 и 18 %).

#### *Установка для электрофореза*

Электрофорез исследуемых белковых систем проводили на установке «Multiphor II». Установка (рис. 3.1.) состоит из электродного резервуара с 2 камерами на 1,5 л; 2 электродов (катодного и анодного); столика, подключенного к системе охлаждения, и прозрачной антиконденсационной крышки, защищающей прибор от пыли и обеспечивающей надежное термостатирование.

В электродный резервуар наливают 2,5 л электродного буфера с рН 8,3 (0,025 М (гидроксиметил)аминометана, 0,192 М глицина, 0,1 % додецилсульфата натрия, бидистиллированная вода).

Гель, полимеризованный на пластинке, помещают на охлажденный до 15 °С и смазанный силиконовым маслом столик открытой поверхностью вверх. При этом нижняя часть пластинки с гелем должна находиться со стороны катода (-), а верхняя – со стороны анода (+).



Рис. 3.1. Установка для электрофореза «Multiphor II».

Электрическая цепь замыкается через 5 – 10-слойные фитили из фильтровальной бумаги, одним концом погруженные в электродные резервуары, а другим - прижатые к гелю с перекрытием в 10 – 12 мм. При наложении фитилей на гель следует следить за отсутствием воздушных пузырей между ними (рис. 3.2).

Рядом с катодным фитилем на гелевую пластинку помещают силиконовую полоску со специальными щелями ("колодцами"), в которые наносятся пробы.

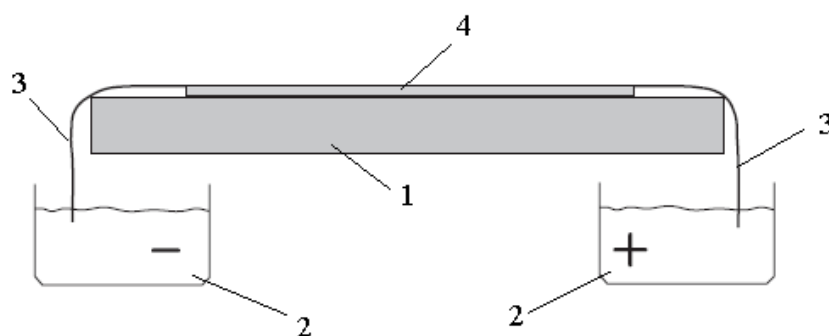


Рис. 3.2. Установка бумажных фитилей: 1 — охлаждающий столик; 2 — электродные резервуары; 3 — фитили; 4 — гель.

### *Пробоподготовка*

Готовят «стоковый» буферный раствор: растворяют 3 г (гидроксиметил)-аминометана в 40 мл дистиллированной воды, устанавливают рН 7,5 уксусной кислотой. Доводят объем раствора до 50 мл дистиллированной водой.

Для приготовления буферного раствора для проб (рН 6,8) 5 мл «стокового» буферного раствора смешивают с 0,5 г додецилсульфата натрия и 5 мг бромфенолового синего. Доводят объем раствора до 50 мл дистиллированной водой, тщательно перемешивают.

Перед нанесением на гелевую пластинку пробы смешивают с буферным раствором для проб в соотношении 1:1 и выдерживают на водяной бане при 95 °С в течение 3 мин.

### *Проведение эксперимента*

Пробы, смешанные с буферным раствором, помещали с помощью шприца в "колодцы" для проб на поверхности геля (5 мкл пробы в один "колодец"). Электрофорез проводили при температуре 15 °С, напряжении 600 В, силе тока 50 мА, мощности 30 Вт до тех пор, пока разделяемое вещество не приблизится к анодному фитилю. После окончания электрофореза проводили окрашивание гелевой пластинки по методу Кумасси [112].

### *Обработка результатов электрофореза*

Молекулярную массу белковых фракций определяли по калибровочному графику, построенному по разделению стандартных маркеров (*Pharmacia Biotech*), которые представляют собой белки с известной молекулярной массой от 14,4 до 220 кДа. В качестве примера на рис. 3.3 представлен калибровочный график, построенный по результатам электрофоретического разделения стандартных маркеров (*Pharmacia Biotech*).

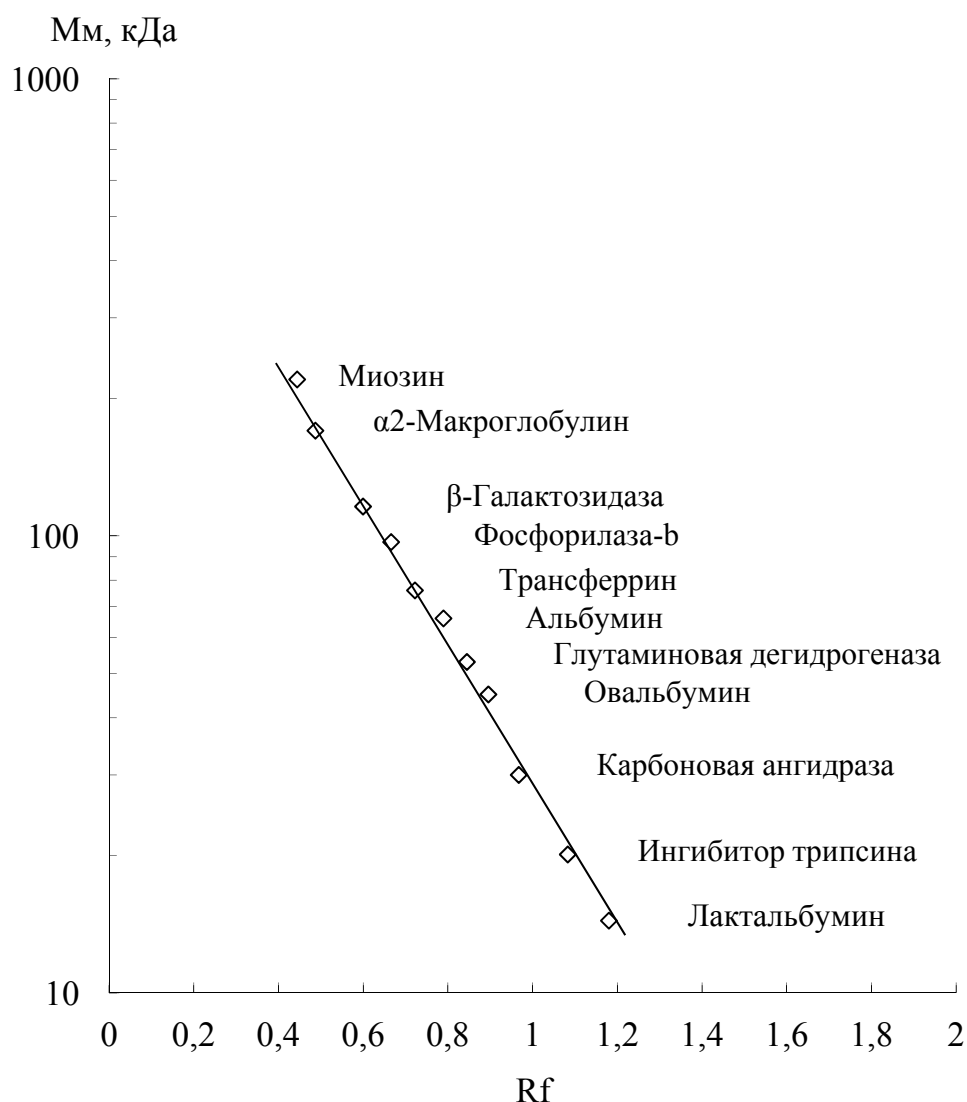


Рис. 3.3. Калибровочный график для определения молекулярных масс исследуемых соединений.  $R_f$  — относительная подвижность вещества (отношение дистанции, пройденной веществом в полиакриламидном геле пластинки к ширине пластинки) [155].

Подобные калибровочные графики строят для каждого эксперимента по результатам разделения стандартных маркеров. На рис. 3.4 (а, б) представлена электрофореграмма стандартных маркеров (*Pharmacia Biotech*) и калибровочный график, построенный в результате ее обработки.

Для получения спектрограмм образцов проводили компьютерную обработку электрофореграмм про помощи программы ImageJ (рис. 3.4 (в)).

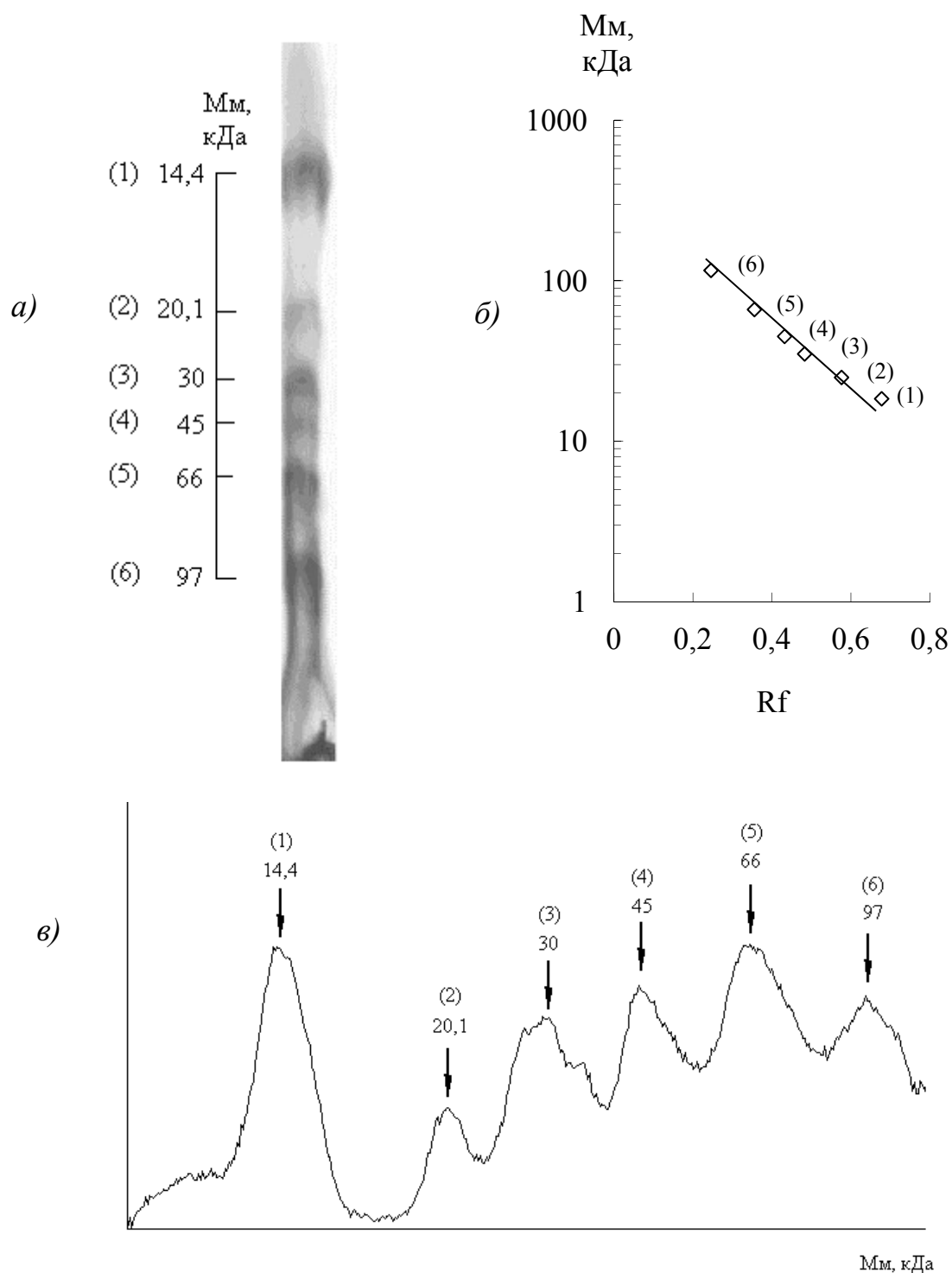


Рис. 3.4. Электрофореграмма стандартных низкомолекулярных маркеров *Pharmacia Biotech*(а), а также калибровочный график (б) и спектрограмма (в), полученные в результате ее обработки: 1 –  $\alpha$ -лактальбумин (14,4 кДа); 2 – ингибитор трипсина (20,1 кДа); 3 – карбоновая ангидраза (30 кДа); 4 – овальбумин (45 кДа); 5 – альбумин (66 кДа); 6 – фосфорилаза-в

### 3.5. Реологические методы

#### 3.5.1. Ротационная вискозиметрия

Для определения эффективной вязкости растворов ферментативных белковых гидролизатов [54, 108] использовали ротационный вискозиметр «Полимер РПЭ-1М.2». Его измерительная ячейка состоит из двух коаксиальных цилиндров: неподвижного наружного и вращающегося внутреннего, вставленных в термостатируемую камеру. Радиус наружного цилиндра составляет 12 мм, внутреннего – 8,74 мм. Длина измерительной поверхности внутреннего цилиндра 30 мм.

Исследуемую систему помещали в зазор между коаксиальными цилиндрами до кромки верхнего торца внутреннего цилиндра, сверху на исследуемую систему наносили тонкий слой вазелинового масла для предотвращения испарения жидкости в ходе эксперимента. Эффективную вязкость  $\eta$  измеряли при различных скоростях сдвига в диапазоне скоростей сдвига  $\dot{\gamma}$  от 0,7 до 708,8 с<sup>-1</sup>. Исследования проводили при температуре  $23 \pm 0,1$  °С.

Значения скорости сдвига  $\dot{\gamma}$  (с<sup>-1</sup>) рассчитывали по формуле:

$$\dot{\gamma} = \frac{2 \cdot \omega \cdot R_i^2}{R_i^2 - R_a^2}, \quad (3.6)$$

где  $R_n$  - радиус наружного цилиндра, мм;

$R_v$  – радиус внутреннего цилиндра, мм;

$\omega$  – угловая скорость вращения внутреннего цилиндра, с<sup>-1</sup>;

Напряжение сдвига  $\tau$  (Па) определяли по формуле:

$$\tau = \eta \cdot \dot{\gamma} \quad (3.7)$$

#### 3.5.2. Капиллярная вискозиметрия

Кинематическую вязкость растворов гидролизатов определяли методом капиллярной вискозиметрии [54] с помощью капиллярного вискозиметра ВПЖ-



4, помещенного в водную термостатируемую ячейку  $t = (40,0 \pm 0,1) \text{ } ^\circ\text{C}$ . Внутренний диаметр капилляра 0,37 мм. Время термостатирования перед измерением 30 мин. Для каждой системы проводили измерения времени истечения раствора гидролизата по капилляру  $t_{\text{ист}}$  и вычисляли кинематическую вязкость  $\nu$  исследуемой системы по формуле:

$$\nu = \frac{g}{9,807} t_{\text{ист}} \cdot K, \quad (3.8)$$

где  $K$  - постоянная вискозиметра ( $K = 0,01097 \text{ м}^2/\text{с}^2$ );

$g$  - ускорение свободного падения в месте измерений в  $\text{м}/\text{с}^2$ ;

$t_{\text{ист}}$  - время истечения раствора гидролизата, с.

Расчет динамической вязкости производили по формуле:

$$\eta = \nu \cdot \rho, \quad (3.9)$$

где  $\rho$  - плотность раствора гидролизата, определенная методом рефрактометрии,  $\text{кг}/\text{м}^3$

### 3.6. Атомно-абсорбционная спектроскопия

Метод основан на измерении величины поглощения излучения внешнего источника веществом, находящемся в атомарном состоянии, и используется для аналитического определения содержания различных элементов в исследуемых системах [36]. Методом атомно-абсорбционной спектроскопии определяли содержание тяжелых металлов в тканях гидробионтов и полученных гидролизатах. В работе использовали атомно-абсорбционные спектрофотометры AAnalyst 800 фирмы Perkin Elmer и AAS 30 фирмы Carl Zeiss JENA, которые позволяют определить содержание элементов в исследуемых системах с точностью до 0,01 мкг/л.

Пробоподготовку проводили следующим образом: навеску сырого образца (кости и/или филе рыбы) 1-5 г помещали в стеклянные бюксы и высушивали в электрической муфельной печи при температуре  $105 \text{ } ^\circ\text{C}$  до постоянного веса. Пробоподготовку ферментативных белковых гидролизатов и ферментного препарата, представляющих собой сухие порошки, не проводили.

После этого производили разложение образца на системе микроволновой подготовки проб Speedwave Four фирмы Berghof. Навеску высушенного образца массой 0,35 г помещали в автоклав модели ДАК-100/4. К навеске добавляли 8 мл 65 %-ного раствора  $\text{HNO}_3$  и 2 мл 30 %-ного раствора  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Автоклав помещали в микроволновую систему Speedwave Four. Условия проведения процесса разложения: температура 200 °С, давление 40 бар, энергия магнетрона 90 %, время нагрева 15 мин., время разложения 40 мин.

После окончания процесса разложения автоклав охлаждали в течение 20 мин. Разложенный образец представляет собой прозрачную бесцветную или светло-зеленого цвета жидкость без примесей.

После разложения образец подавали на атомно-абсорбционный спектрофотометр для определения содержания тяжелых металлов (Cu, Mn, Cr, Ni, Co, Cd, Fe, Zn). Точность определения 0,01 мкг/г исследуемого вещества.

### **3.7. Микробиологический анализ белковых гидролизатов**

Микробиологический анализ проводят для оценки возможности использования ферментативных гидролизатов в составе микробиологических питательных сред. В основе метода лежит введение исследуемых гидролизатов в состав микробиологических диагностических сред в качестве питательной основы и оценке ростовых характеристик шести тест-культур: *Staphylococcus aureus* Wood - 46, *Escherichia coli* 055 K59 3912/41, *Pseudomonas aeruginosa* 27/99, *Shigella flexneri* 1a 8516 и *Salmonella typhi* H - 901.

Оценка качества питательных сред проводится по следующим показателям:

- чувствительность к росту тест-культур;
- стабильность основных морфологических, культуральных, биохимических (образование индола и сероводорода) свойств;
- эффективность роста (выход биомассы с 1 см<sup>3</sup> среды).

Микробиологические исследования проводили в соответствии с требованиями фармакопейной статьи на питательные среды ФС - 42-3378-97 «Питательный агар для культивирования микроорганизмов сухой». Данная

фармакопейная статья распространяется на питательный бульон для культивирования микроорганизмов, который получают высушиванием концентрированного гидролизата рыбной муки и затем смешивают его с хлоридом натрия. Среда признается качественной при условии, если каждая из тест-культур дает рост не более чем через 48 часов инкубации в виде придонного осадка легко «разбивающегося» при встряхивании пробирки, не ниже, чем из разведения  $10^{-7}$  на всех трех засеваемых пробирках и не менее, чем в одной из трех засеянных пробирках из разведения  $10^{-8}$ . Реакции на сероводород и индол должны быть четкими.

### **3.8. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)**

Данный метод используется для разделения различных смесей молекул (макромолекулы синтетических полимеров и биополимеров), ионов и устойчивых радикалов. Он основан на разделении веществ, входящих в состав исследуемых растворов при прохождении через слой адсорбента [111].

Анализ содержания аминокислот в растворе гидролизата выполняли на жидкостном хроматографе модель L-8800 фирмы “Hitachi”(Япония). Анализ проводили в стандартном режиме анализа белковых гидролизатов, используя высокоэффективные ионообменные хроматографические колонки и специальный нингидриновый реагент для детектирования элюирующихся аминокислот.

Разделение аминокислот осуществляли на ионообменной колонке с использованием ступенчатого градиента натрий-цитратных буферных растворов возрастающего pH и молярности. Анализ выполняли в режиме анализа белковых гидролизатов с последующей обработкой данных на on-line системе «МультиХром 1.52» для Windows 98 (Россия). Метод исследования представляет собой ионообменную хроматографию аминокислот на сильном катионообменнике: сульфированном сополимере стирола с дивинилбензолом. Для детекции элюируемых аминокислот используется специальный реагент нингидрин [131].

### 3.9. Метод квазиупругого рассеяния света

Размер частиц и распределение частиц по размерам в водных растворах (дисперсиях) гидролизатов определяли методом квазиупругого рассеяния света (фотонная корреляционная спектроскопия) [137] на приборе Malvern Zetasizer Nano ZS фирмы «Malvern Instruments Ltd». Данный метод используется для измерения размеров частиц и основан на определении коэффициента диффузии дисперсных частиц в жидкости путем анализа характерного времени флуктуаций интенсивности рассеянного света.

Источник света – гелий-неоновый лазер,  $\lambda = 633$  нм, мощность источника света 5 мВт.

Средний диаметр частиц в водной дисперсии гидролизата рассчитывали по формуле:

$$d_{cp} = \frac{\sum_{i=1}^n d_i^3 \cdot \omega_i}{\sum \omega_i}, \quad (3.10)$$

где  $d_i$  – размер частиц в каждой фракции,

$\omega_i$  – доля частиц  $i$ -й фракции в растворе гидролизата

$n$  – количество фракций в водной дисперсии гидролизата.

### 3.10. Определение стабильности и реологических характеристик эмульсий «углеводород – раствор гидролизата»

В работе определяли стабильность растворов гидролизатов в зависимости от объемной доли этих растворов при постоянном объеме эмульсии [29].

Эмульсии получали диспергированием 10% водного раствора гидролизата и углеводорода (гептана) в различных объемных соотношениях (от 10 до 90%) на диспергаторе ИКА Т 25 Digital со скоростью перемешивания 10000 об./мин в течение 5 мин.

После получения пробу эмульсии оставляли на сутки. Затем определяли объемы раствора гидролизата, эмульсии и углеводородной фазы; рассчитывали их объемные доли и строили диаграммы стабильности, на которых по оси абсцисс откладывали исходную долю гептана в эмульсии; по оси ординат слева

снизу вверх – долю отделившейся фазы раствора гидролизата, справа сверху вниз – долю отделившейся масляной фазы.

Реологические характеристики устойчивых эмульсий (вязкость и напряжение сдвига) измеряли при сдвиговых деформациях на реометре Physica MCR302 (Anton Paar) с использованием измерительной ячейки "конус-плоскость".

### **3.11. Сканирующая электронная микроскопия**

Морфологию поверхности твердых частиц негидролизованного белка и полученных ферментативных гидролизатов изучали методом сканирующей электронной микроскопии.

Исследуемый образец осаждали на подложку из полированной нержавеющей стали методом электролитического осаждения. Для улучшения контраста электронномикроскопического изображения на электроосажденный образец напыляли тонкий слой проводящего материала (золото) толщиной 20 нм методом катодного напыления в среде аргона. Микроскопирование проводили на сканирующем электронном микроскопе с полевой эмиссией «MIRA3» фирмы Tescan.

## **Глава 4. Результаты и обсуждение**

### **4.1. Кинетические закономерности протеолиза белоксодержащего сырья – отходов рыбопереработки**

В работе изучали кинетику ферментативного гидролиза белоксодержащего рыбного сырья и влияние на кинетические параметры таких факторов как продолжительность гидролиза, вид сырья, вид ферментного препарата, его концентрация и способ внесения в реакционную смесь.

#### **4.1.1. Продолжительность гидролиза**

Изучение влияния продолжительности процесса ферментативного гидролиза на степень расщепления белковых макромолекул проводилось с целью установления необходимого периода времени, в течение которого белки, содержащиеся в исследуемом сырье, будут гидролизованы ферментным препаратом.

В качестве параметров, определяющих полноту протекания процесса гидролиза, были выбраны концентрация аминного азота в растворе гидролизата (содержание концевых аминок групп пептидов, образующихся при расщеплении белковых молекул) и рассчитанная на ее основе степень гидролиза. Выбор этих параметров объясняется тем, что они являются наиболее объективными, а методы их определения наименее трудоемки [60].

При изучении влияния продолжительности процесса гидролиза на степень гидролитического расщепления рыбных белков провели ферментативный гидролиз отходов переработки трески гепатопанкреатином.

На рисунке 4.1 представлена зависимость содержания аминного азота в гидролизате трески от продолжительности процесса гидролиза.

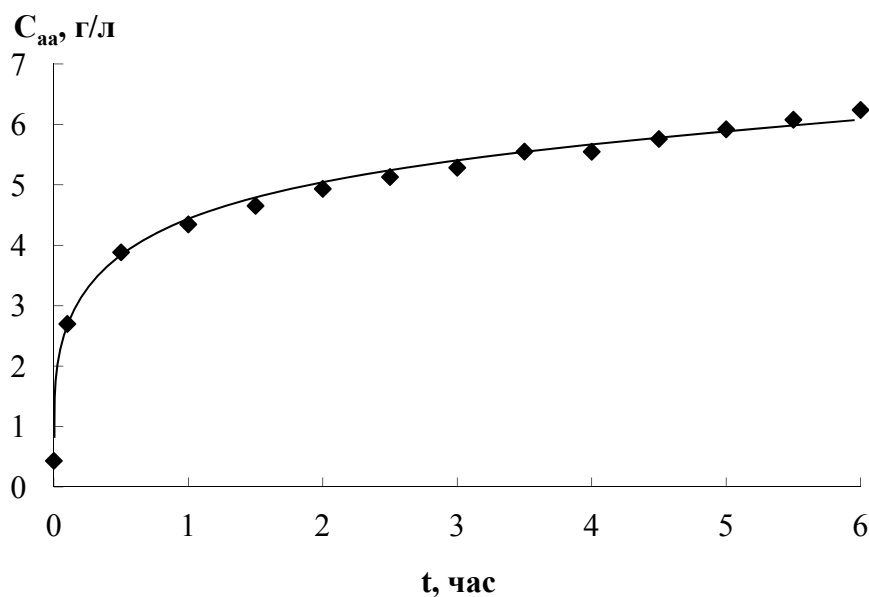


Рис. 4.1. Зависимость содержания аминного азота в растворе гидролизата от времени гидролиза. Используемый ферментный препарат – гепатопанкреатин,  $C_{\text{фп}} = 6$  г/кг сырья, внесение в реакционную смесь однократное

По результатам исследования установлено, что в негидролизованном сырье присутствует небольшое количество аминного азота (в пределах 0,5 – 1,5 г/л), так называемый «фон», что подтверждает литературные данные [60]. Наличие «фона» объясняется тем, что рыбное сырье в процессе хранения подвергается автолизу под действием собственных ферментов.

На основании данных о содержании аминного азота в сырье по формуле 3.2 можно определить степень гидролиза сырья. Установлено, что наиболее быстро гидролиз гепатопанкреатином протекает в первые 30-60 минут, а затем постепенно замедляется. В течение первого часа степень гидролиза возрастает в 5 раз по сравнению с начальным моментом времени и в течение последующих 4 часов увеличивается только в 1,5 раза. Следовательно, проведение ферментативного гидролиза дольше 6 часов является не целесообразным, поскольку не приводит к значительному увеличению степени гидролиза.

На основании экспериментальных данных по накоплению в растворе гидролизата аминного азота (рис. 4.1) в рамках метода формальной кинетики может быть рассчитана скорость реакции ферментативного гидролиза.

Обычно подобная реакция рассматривается как реакция первого порядка, (по продукту реакции аминному азоту), в ходе которой фермент не расходуется. В этом случае предполагается, что реакционная система представляет собой сумму независимо реагирующих белковых макромолекул, скорость распада каждой из которых определяется её кинетическими характеристиками.

При этом увеличение концентрации аминного азота во времени описывается уравнением [106]:

$$\tilde{N}_{\dot{a}\dot{a}} = \tilde{N}_{\dot{a}\dot{a}i} (1 - e^{-kt}) \quad (4.1)$$

или

$$-\ln(\tilde{N}_{\dot{a}\dot{a}i} - \tilde{N}_{\dot{a}\dot{a}}) + \ln \tilde{N}_{\dot{a}\dot{a}i} = kt, \quad (4.2)$$

где  $k$  - константа скорости реакции,  $t$  – время.

Формула с учетом поправки на содержание аминного азота в негидролизованном сырье выгладит следующим образом:

$$-\ln([\tilde{N}_{\dot{a}\dot{a}i} - \tilde{N}_{\dot{a}\dot{a}0}] - [\tilde{N}_{\dot{a}i} - \tilde{N}_{\dot{a}\dot{a}0}]) + \ln[\tilde{N}_{\dot{a}\dot{a}i} - \tilde{N}_{\dot{a}\dot{a}0}] = kt \quad (4.3)$$

где  $[C_{\text{общ}}]$  – концентрация общего азота в растворе гидролизата, г/л;

$[C_{aa}]$  – концентрация продуктов реакции (аминного азота), г/л;

$[C_{aa0}]$  – фоновая концентрация аминного азота, г/л;

$t$  – время гидролиза, с.

На рисунке 4.2 представлена кинетическая кривая ферментативного гидролиза (рис. 4.1.), построенная в координатах уравнения 4.3.

При этом очевидно, что линейная аппроксимация в данном случае не позволяет достоверно определить скорость реакции гидролиза. Коэффициент корреляции  $R = 0,75$ . Предположительно это связано с наличием в исходном сырье двух типов белков: легко расщепляемых под действием ферментного препарата и труднорасщепляемых.



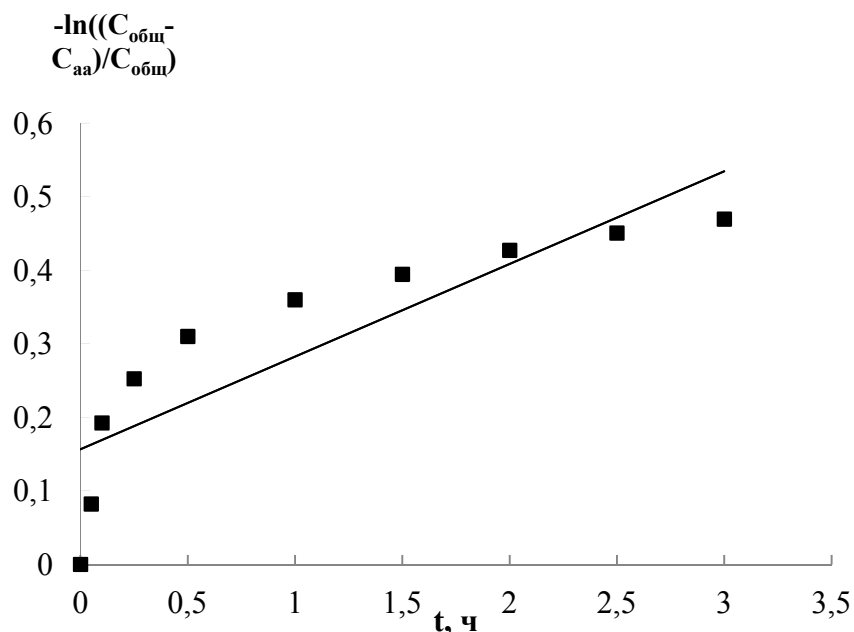


Рис. 4.2. Кинетическая кривая ферментативного гидролиза тканей трески (рис 4.1). Используемый ферментный препарат – гепатопанкреатин,  $C_{\text{фп}} = 6$  г/кг сырья, внесение в реакцию однократное

В соответствии с этим предположением экспериментальную кривую (рис. 4.1) можно разбить на два участка, характеризующих «быструю» стадию гидролиза (0-0,5 часа), когда происходит резкое изменение концентрации аминного азота в растворе за счет гидролиза легкорасщепляемых молекул белка, и «медленную» (после 0,5 часа), когда разрушаются труднорасщепляемые молекулы белка и изменение концентрации аминного азота гораздо меньше.

На рисунке 4.3 представлена кинетическая кривая ферментативного гидролиза (рис. 4.1.), построенная в координатах уравнения 4.3 и произведена ее аппроксимация в виде ломаной линии с двумя прямолинейными участками, которые условно характеризуют «быструю» и «медленную» стадии процесса.

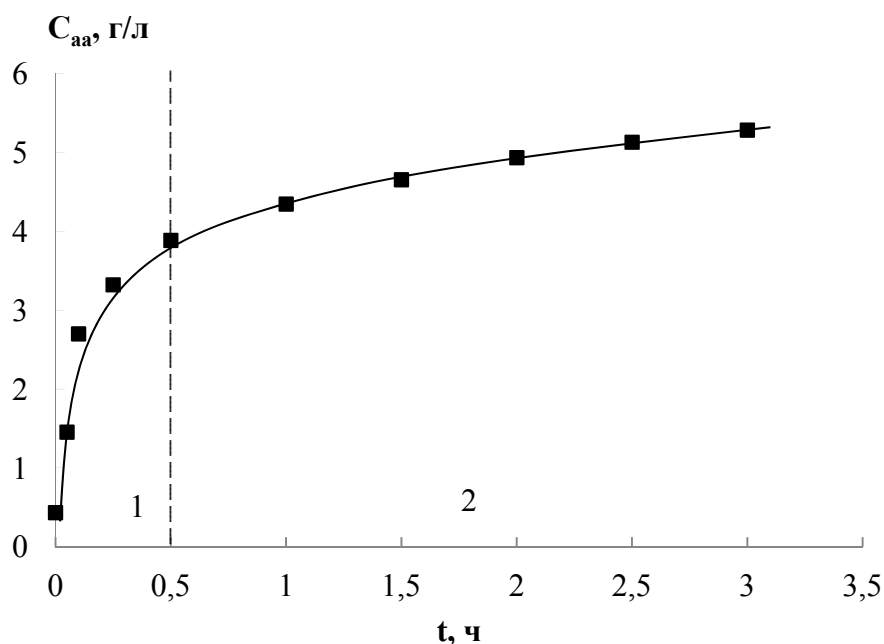


Рис. 4.3. «Быстрая» (1) и «медленная» (2) стадия ферментативного гидролиза на примере содержания аминокислот в растворе гидролизата. Используемый ферментный препарат – гепатопанкреатин,  $C_{фп} = 6$  г/кг сырья, внесение в реакционную смесь однократное

Каждая из этих стадий характеризуется максимальной скоростью накопления продуктов реакции в растворе в процессе гидролиза:  $V_1$  – для «быстрой» стадии и  $V_2$  – для «медленной» (рис. 4.4).

Скорости накопления продуктов реакции, вычисленные по формуле 4.3, имеют следующие значения:  $V_1 = 1,70 \cdot 10^{-4}$  (г/л·с);  $V_2 = 0,24 \cdot 10^{-4}$  (г/л·с). Очевидно, что на «медленной» стадии скорость реакции ниже, чем на «быстрой» стадии.

Снижение скорости ферментативного гидролиза может быть связано с уменьшением активности ферментного препарата. Причиной последнего может служить, во-первых, температурная инактивация ферментного препарата, т.е. разрушение молекул фермента под действием температуры, а во-вторых, автолиз гепатопанкреатина – процесс, при котором молекулы фермента, имеющие белковую природу подвергаются саморасщеплению.

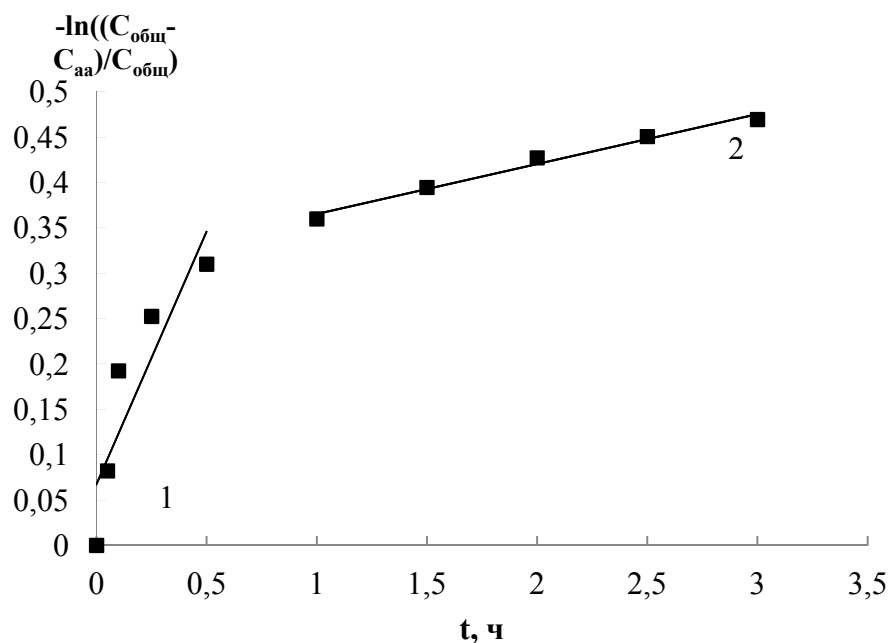


Рис. 4.4. Кинетическая кривая ферментативного гидролиза тканей трески, условно разделенная на «быструю» (1) и «медленную» (2) стадии. Используемый ферментный препарат – гепатопанкреатин,  $C_{\text{фп}} = 6$  г/кг сырья, внесение в реакцию смесь однократное

#### 4.1.2. Вид сырья

В связи с тем, что количество промысловых видов рыб велико, отходы каждого из них могут рассматриваться в качестве потенциального источника для получения ферментативных белковых гидролизатов. В этом случае определенный интерес представляет изучение кинетических характеристик ферментативного гидролиза в зависимости от вида гидролизующего сырья. В работе представлены данные по гидролизу тканей атлантической трески и морского окуня ферментным препаратом, выделенным из гепатопанкреаса камчатского краба. Изучен также гидролиз рыбной желатины, полученной из рыбного сырья, которую рассматривали как модельную систему. Образцы объектов исследования различаются по аминокислотному составу, содержанию жира, белка (раздел 2.1) и общего азота (таблица 4.1).

На рисунке 4.5 приведена зависимость содержания аминного азота в гидролизатах окуня (кривая 1), трески (кривая 2) и рыбной желатины (кривая 3) от продолжительности гидролиза при однократном внесении ферментного препарата.

Таблица 4.1

Содержание общего азота в негидролизованых тканях рыбного сырья и рыбной желатины

Вид сырья	Треска	Окунь	Желатина
$C_{\text{Нобщ}}, \%$	$1,29 \pm 0,02$	$2,41 \pm 0,02$	$0,46 \pm 0,01$

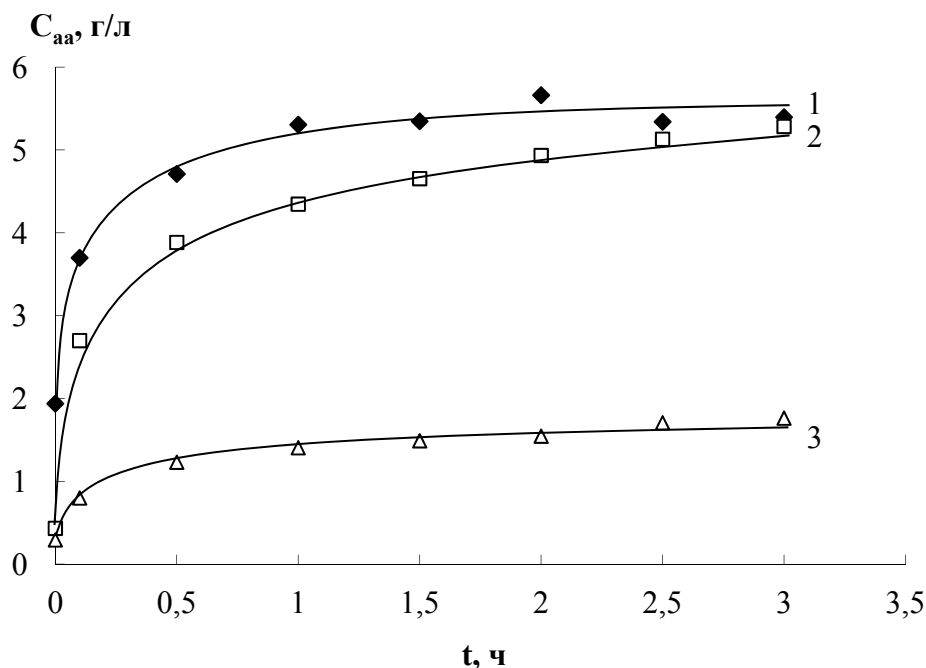


Рис. 4.5. Зависимость содержания аминного азота в гидролизатах морского окуня (1), трески (2) и рыбной желатины (3) от времени гидролиза. ферментный препарат вносили однократно,  $C_{\text{фп}} = 6$  г/кг сырья

По результатам исследования установлено, что концентрация аминного азота в гидролизатах трески и окуня через 3 часа гидролиза составляет соответственно 5,3 и 5,2 г/л. Через 6 часов концентрация аминного азота возрастает до 6,5 г/л для трески и до 6,9 г/л для окуня. Это соответствует литературным данным о содержании аминного азота в рыбных гидролизатах (от 3 г/л и выше) [44, 60].

На рисунке 4.6 приведены зависимости степени гидролиза исследуемых систем (рыбной желатины и отходов переработки трески и морского окуня). Из рисунка видно, что через 3 часа после начала процесса гидролиза степень гидролитического расщепления тканей трески составляет 40,8 %, а морского

окуня – почти в 2 раза меньше (23 %).

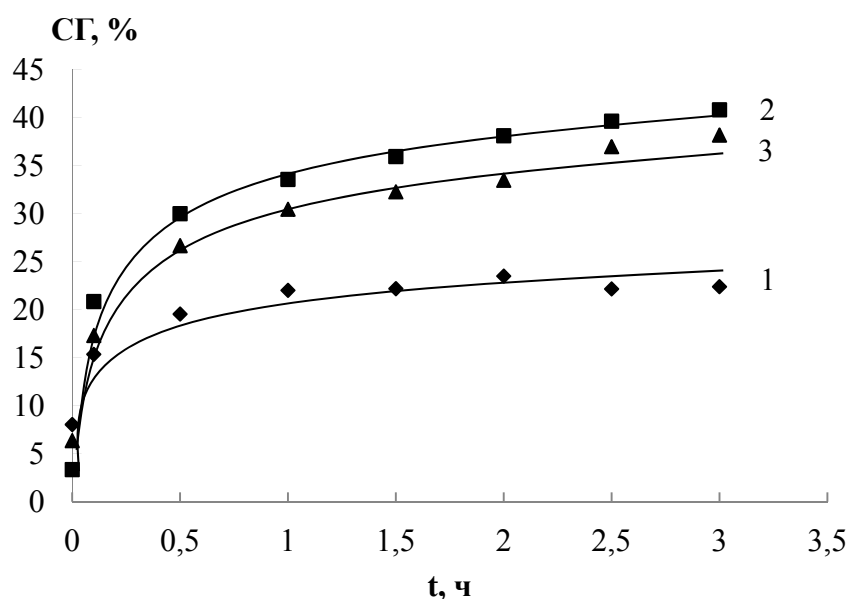


Рис. 4.6. Зависимость степени гидролиза морского окуня (1), трески (2) и рыбной желатины (3) от времени гидролиза. Ферментный препарат вносили однократно,  $C_{\text{фп}} = 6$  г/кг сырья

Через 6 часов максимальная степень гидролиза тканей трески и морского окуня достигает соответственно 50,7 % и 25,4 %. Такую разницу можно объяснить более высоким содержанием общего азота в морском окуне по сравнению с треской. Также причиной может являться то, что белки, входящие в состав тканей трески, являются более подходящим субстратом для данного ферментного препарата и поэтому расщепляются более эффективно [57].

Содержание аминного азота в гидролизате желатины через 6 часов гидролиза составляет 2,3 г/л, что соответствует степени гидролиза 43,8 % (рис. 4.6, кривая 3). Установлено, что рыбная желатина эффективно гидролизуется ферментным препаратом из гепатопанкреаса камчатского краба. Это связано с его высокой коллагеназной активностью, которая подтверждается в работах ряда авторов [100].

На рисунке 4.7 представлена диаграмма зависимости степени гидролиза от вида сырья.

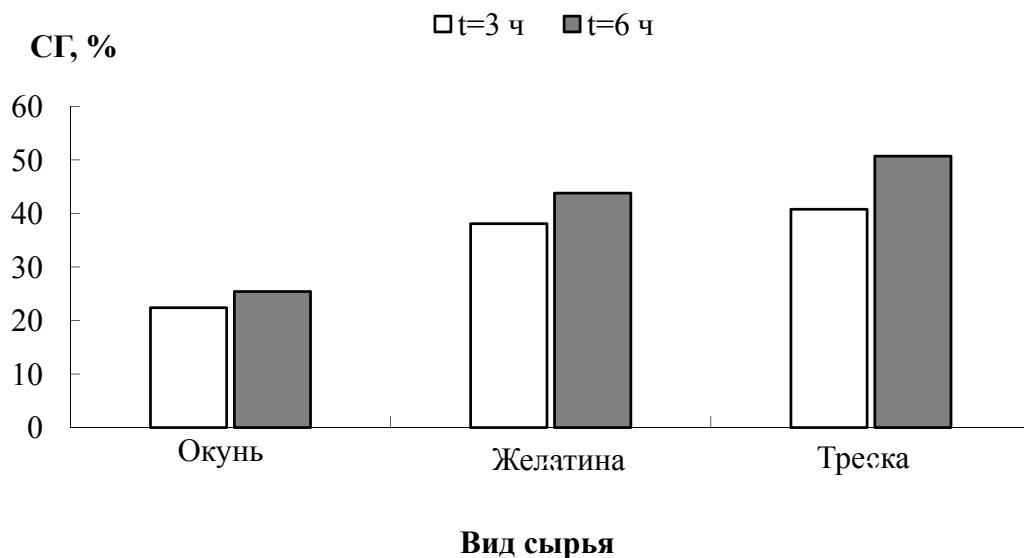


Рис. 4.7. Зависимость степени гидролиза от вида сырья. ферментный препарат вносили однократно.  $C_{\text{фп}} = 6$  г/кг сырья,  $t = 3$  часа, 6 часов.

На рисунке 4.8 представлены кинетические кривые ферментативного гидролиза разных видов сырья (рис. 4.5), построенные в координатах уравнения 4.3 и разбитые на «быструю» и «медленную» стадии.

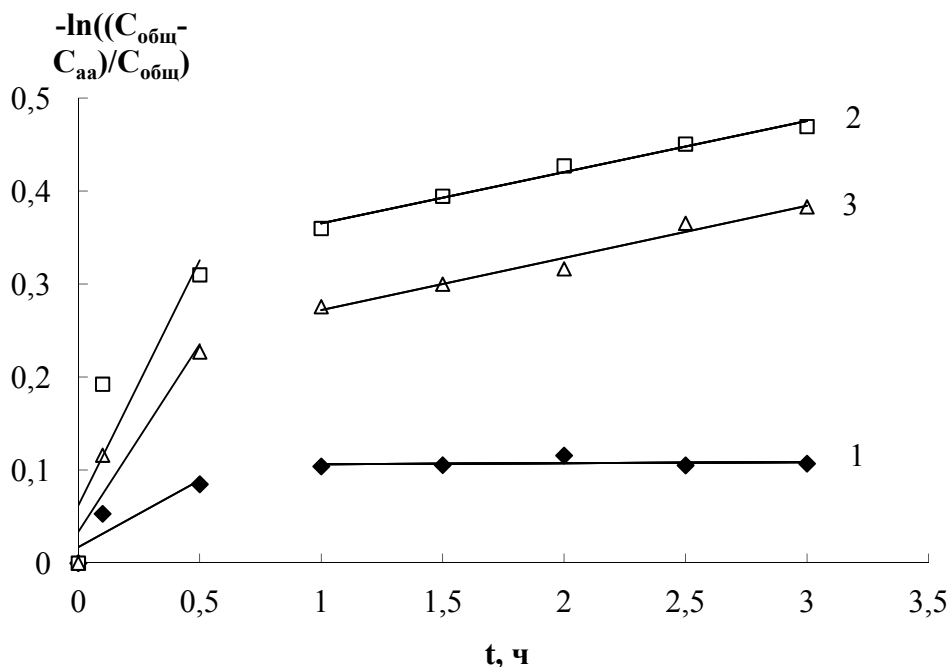


Рис. 4.8 Кинетические кривые ферментативного гидролиза окуня (1), трески (2) и рыбной желатины (3) разделенные на «быструю» и «медленную» стадии. Ферментный препарат вносили однократно,  $C_{\text{фп}} = 6$  г/кг сырья

В таблице 4.2 приведены скорости реакции для «быстрых» (0-0,5 ч) и «медленных» (0,5 – 3 ч) стадий гидролиза разных видов рыбного сырья при однократном внесении ферментного препарата в реакционную смесь. Расчет производили по формуле (4.3).

Таблица 4.2

Скорости «быстрой» ( $V_1$ ) и «медленной» ( $V_2$ ) стадий гидролиза рыбной желатины и белков тканей рыбного сырья

$V$	Треска	Окунь	Желатина
$V_1 \cdot 10^4$ (г/л·с)	$1,70 \pm 0,04$	$1,43 \pm 0,03$	$2,14 \pm 0,02$
$V_2 \cdot 10^4$ (г/л·с)	$0,24 \pm 0,02$	$0,21 \pm 0,04$	$0,50 \pm 0,03$

Как видно из таблицы, наибольшие скорости на «быстрой» и «медленной» стадии характерны для реакции ферментативного гидролиза отходов трески. Значения этих параметров в совокупности с высокой степенью гидролиза свидетельствует об эффективном расщеплении гепатопанкреатином белков, входящих в состав тканей трески. Скорости реакции при гидролизе желатины примерно на 20% меньше. Наименьшее значение имеют скорости реакции для гидролиза отходов морского окуня.

По результатам исследования можно предположить, что в данном случае вид рыбного сырья влияет на кинетические параметры гидролиза. Гидролиз другого белоксодержащего сырья морского происхождения, будет протекать, приблизительно таким же образом, что и гидролиз трески, морского окуня и рыбной желатины, поскольку белки, входящие в состав морских организмов имеют схожую структуру. Однако эффективность процесса ферментативного гидролиза и глубина расщепления белковых молекул будут зависеть от вида рыбного сырья, подвергаемого обработке ферментным препаратом [60]. Это необходимо учитывать при разработки технологии получения ферментативных белковых гидролизатов.

### 4.1.3. Тип ферментного препарата

Выбор ферментного препарата для гидролиза того или иного рыбного сырья имеет большое значение в виду специфичности действия ферментов к белкам различного происхождения. Эффективность гидролитического расщепления белковых молекул, входящих в состав определенного сырья, может различаться при использовании для этих целей разных ферментов.

В работе исследовали эффективность действия двух ферментных препаратов (из гепатопанкреаса камчатского краба и гепатопанкреаса краба-стригуна) по их протеолитической активности. По результатам эксперимента установлено, что активность ферментного препарата из камчатского краба составляет 94,9 мкмоль тур/г, а из краба стригуна - 94,1 мкмоль тур/г.

Поскольку их протеолитическая активность близка, можно предположить, что эффективность их действия будет одинакова.

На рисунке 4.9 представлены электрофореграммы и спектрограммы негидролизованного сырья трески (*a*), а также двух гидролизатов, полученных из него при использовании ферментных препаратов из краба-стригуна (*б*) и камчатского краба (*в*).

Из данных электрофореграммы видно, что в пробе с негидролизированным сырьем содержатся белковые фракции с небольшой молекулярной массой 10 - 90 кДа (рис. 4.9 *a*). Это связано с тем, что для электрофореза использовали только водорастворимые белки, содержащиеся в тканях трески. Оба ферментных препарата расщепляют эти белки на несколько фракций, имеющих меньшую молекулярную массу.

После 30 минут гидролиза, проведенного с использованием ферментного препарата из гепатопанкреаса краба-стригуна, в гидролизате наблюдается наличие 4 фракций с молекулярными массами 19,8 кДа; 13,8 кДа; 9,7 кДа и 9,3 кДа (рис. 4.9 *б*). В гидролизате, полученном за то же время при использовании ферментного препарата из гепатопанкреаса камчатского краба,



также обнаружены 4 фракции с молекулярными массами 37,1 кДа; 24 кДа; 14,6 кДа и 10 кДа (рис. 4.9 в).

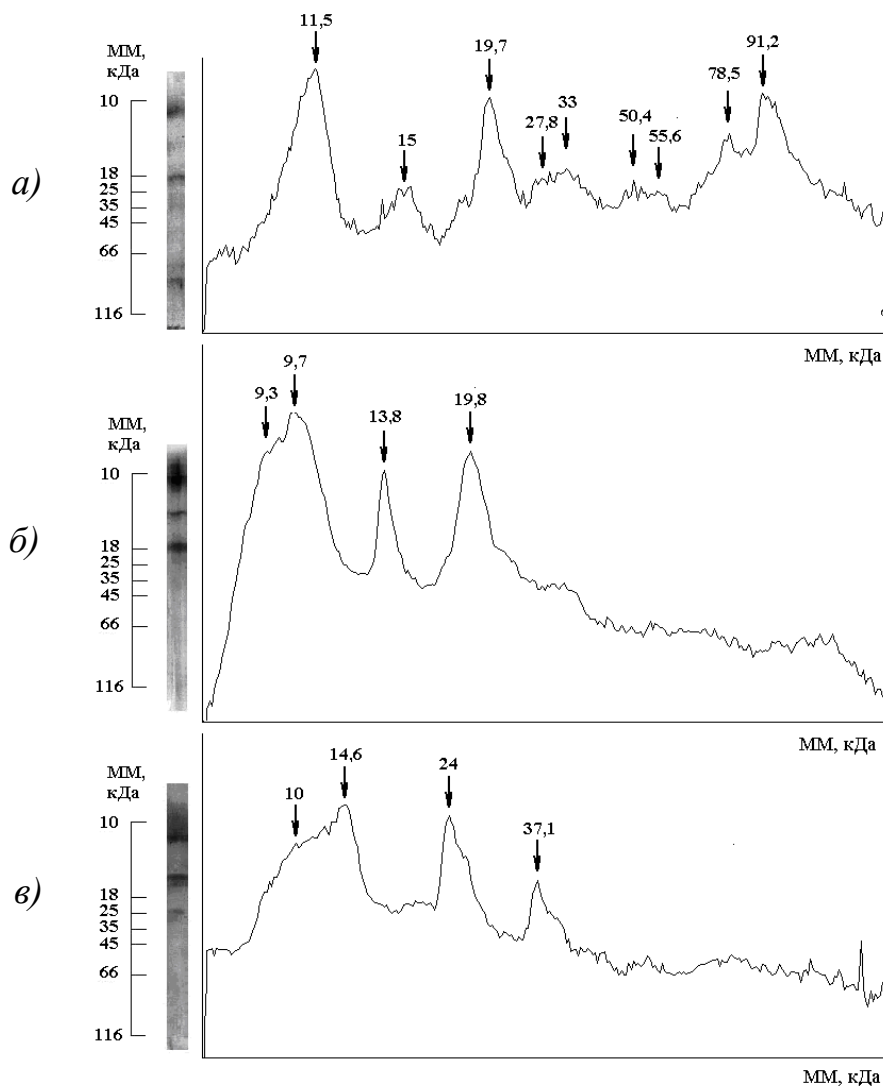


Рис. 4.9. Электрофореграмма и спектрограмма образцов, разделенных по молекулярным массам методом электрофореза: а – негидролизованное белоксодержащее сырье (треска); б, в – гидролизат белков тканей трески, полученный при использовании ферментного препарата из гепатопанкреаса краба-стригуна (б) и камчатского краба (в). Время гидролиза 30 мин, ферментный препарат вносили однократно,  $C_{\text{фп}} = 6$  г/кг сырья

По результатам эксперимента установлено, что процесс ферментативного гидролиза протекает одинаково эффективно при использовании в качестве протеолитических агентов ферментных препаратов, выделенных из гепатопанкреаса камчатского краба и краба-стригуна.

#### 4.1.4. Концентрация ферментного препарата

Количество ферментного препарата, вносимого в реакцию смесь, определяется с учетом активности каждого препарата и его специфичности к сырью, которое подвергается ферментативной обработке. Для изучения влияния количества ферментного препарата на кинетические характеристики процесса гидролиза белки тканей трески гидролизовали при разной концентрации гепатопанкреатина, который добавляли в реакцию смесь.

График, представленный на рис. 4.10., характеризует зависимость степени гидролиза белков тканей трески от времени гидролиза при однократном внесении гепатопанкреатина разной концентрации.

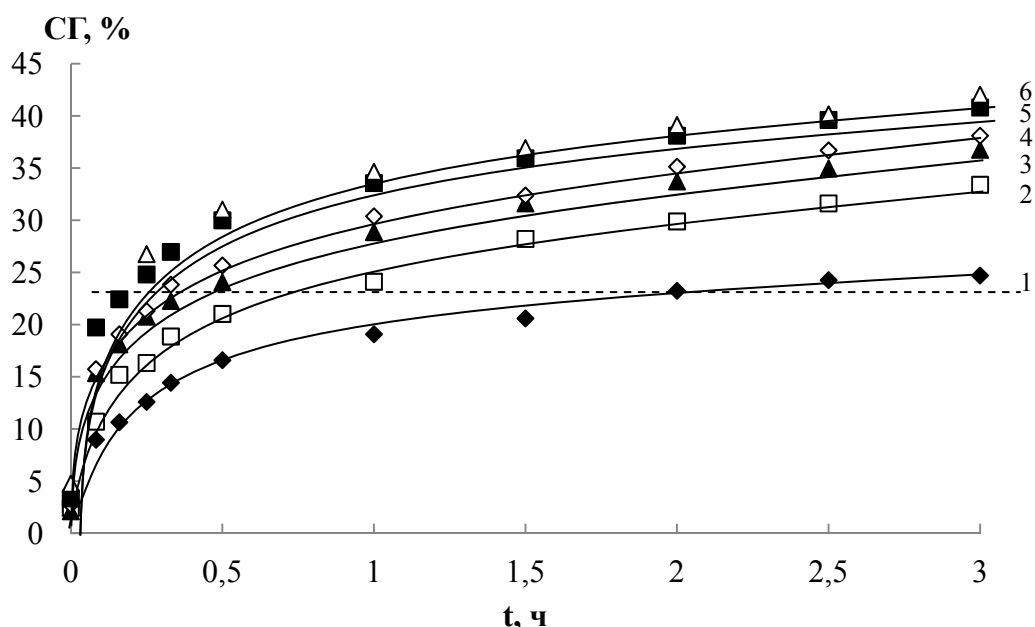


Рис. 4.10. Зависимость степени гидролиза белков тканей трески от времени гидролиза.  $C_{фп}$ , г/кг сырья: 1 (1); 2 (2); 3 (3); 4 (4); 6 (5); 7 (6). Ферментный препарат гепатопанкреатин вносился в реакцию смесь однократно

Из данных, приведенных на рис. 4.10, следует, что увеличение концентрации ферментного препарата позволит сократить время гидролиза для достижения необходимой степени гидролиза белковых молекул, удовлетворяющей технологическим условиям использования гидролизата. Например, увеличение концентрации ферментного препарата с 1 до 2 г/кг

сырья позволяет достичь одной и той же глубины гидролиза (25%), сократив при этом время гидролиза с 3 часов до 1 часа (рис. 4.11). При концентрации ферментного препарата 4 г/кг сырья, необходимое для достижения той же степени гидролиза, сократится до 25 минут, при концентрации 6 г/ кг сырья – до 10-15 минут.

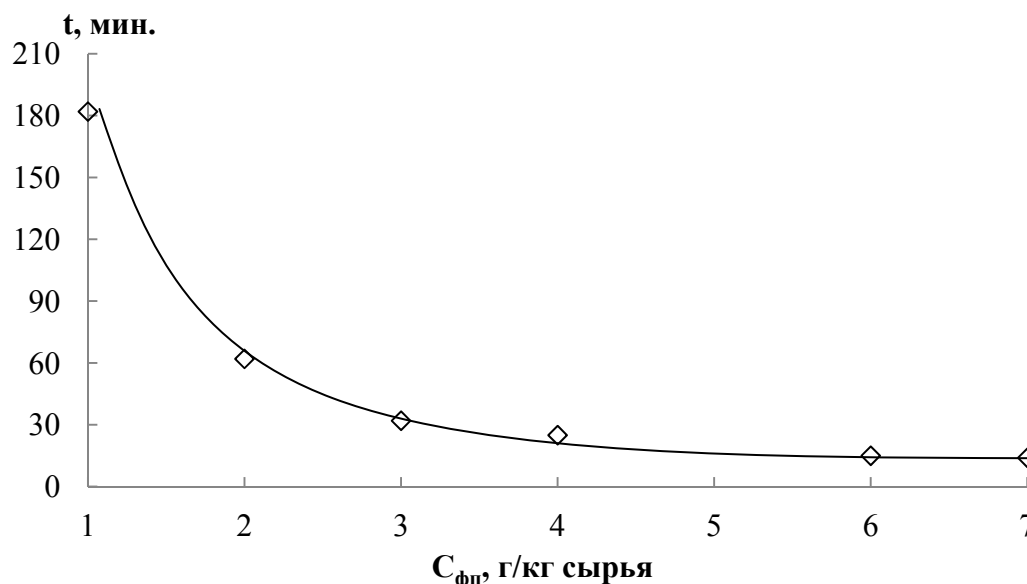


Рис. 4.11. Изменение времени достижения степени гидролиза 25% в зависимости от количества вносимого ферментного препарата

На рисунке 4.12 представлены кинетические кривые ферментативного гидролиза при разном количестве ферментного препарата в реакционной смеси (рис. 4.10), построенные в координатах уравнения 4.3 и разбитые на «быструю» и «медленную» стадии.

В таблице 4.3 приведены рассчитанные по формуле (4.3) скорости реакции ферментативного гидролиза трески в зависимости от концентрации ферментного препарата гепатопанкреатина в реакционной смеси.

Из таблицы видно, что с увеличением концентрации ферментного препарата в реакционной смеси значения скорости реакции растут, однако их рост постепенно замедляется. Зависимость скорости от концентрации ферментного препарата говорит о том, что реакция имеет более высокий порядок. \_\_

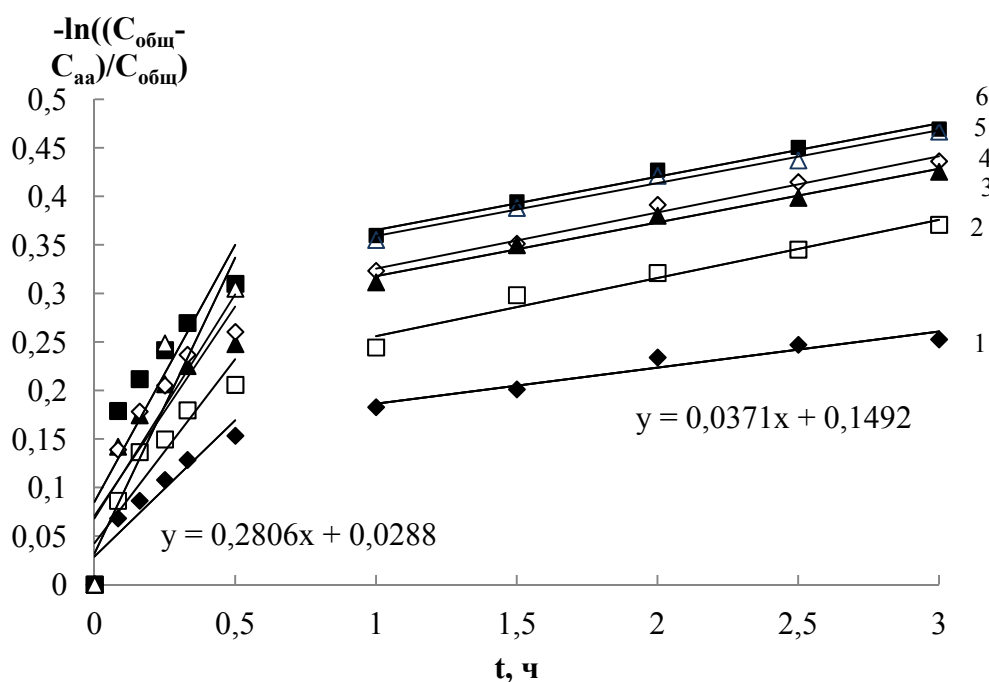


Рис. 4.12 Кинетические кривые ферментативного гидролиза трески разделенные на «быструю» и «медленную» стадии.  $C_{фп}$ , г/кг сырья: 1 (1); 2 (2); 3 (3); 4 (4); 6 (5); 7 (6). Ферментный препарат гепатопанкреатин вносился в реакцию смесь однократно

Таблица 4.3

Значения скорости реакции ферментативного гидролиза белков тканей трески в зависимости от количества гепатопанкреатина

Параметр	$C_{фп}$ , г/кг сырья					
	1	2	3	4	6	7
$V_1 \cdot 10^4$ (г/л·с)	$1,21 \pm 0,03$	$1,39 \pm 0,02$	$1,49 \pm 0,02$	$2,52 \pm 0,03$	$1,70 \pm 0,04$	$1,72 \pm 0,03$
$V_2 \cdot 10^4$ (г/л·с)	$0,20 \pm 0,05$	$0,21 \pm 0,02$	$0,23 \pm 0,04$	$0,23 \pm 0,04$	$0,24 \pm 0,02$	$0,23 \pm 0,02$

Для «быстрой» стадии гидролиза это явление более заметно. Разница между конечными значениями скоростей реакции  $V_1$  составляет более 30%. Для «медленной» стадии, характеризующейся скоростью  $V_2$  – менее 20%.

Также установлено, что при увеличении концентрации ферментного препарата содержание в пробах аминного азота, а, следовательно, и степень гидролиза белков возрастают (рис. 4.13).

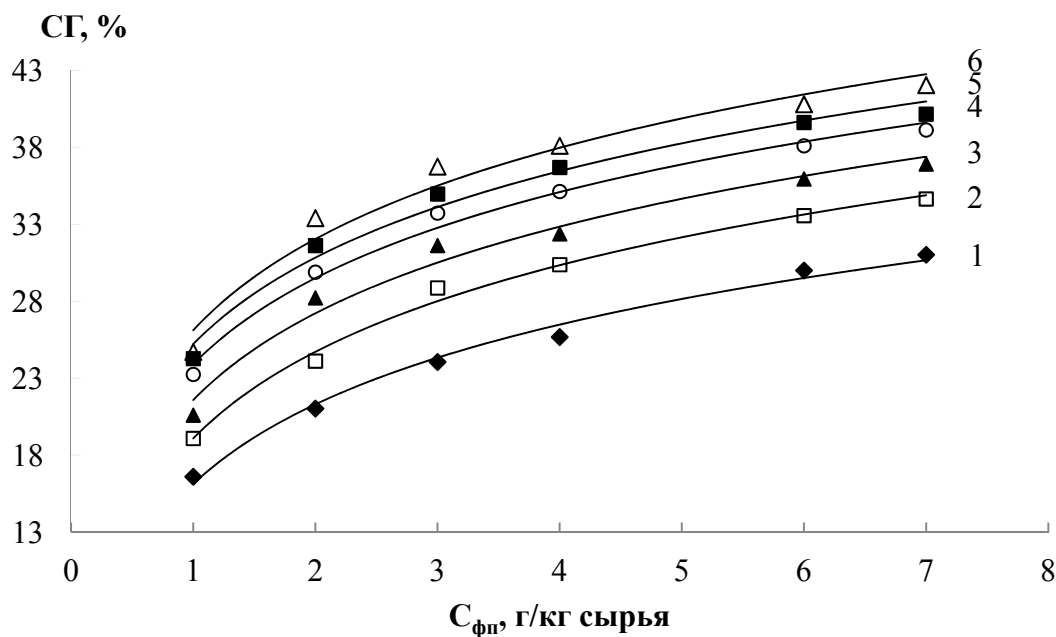


Рис. 4.13. Зависимость содержания аминного азота от концентрации добавляемого ферментного препарата при времени инкубации: 1 – 30 мин., 2 – 60 мин., 3 – 90 мин., 4 – 120 мин., 5 – 150 мин., 6 – 180 мин. Гепатопанкреатин вносили в реакцию смесь однократно

Рост скорости реакции, а также концентрации аминного азота в процессе гидролиза связан с увеличением количества ферментного препарата в реакционной смеси. Причиной этого служит увеличение количества активных центров, к которым может прикрепиться субстрат. Однако количество субстрата ограничено, что может привести к пересыщению реакционной смеси молекулами фермента. Поэтому дальнейшее увеличение количества ферментного препарата приведет к менее заметному изменению скорости реакции гидролиза.

Гидролиз белоксодержащего сырья ферментным препаратом из гепатопанкреаса камчатского краба наиболее эффективно протекает при концентрации препарата 5-7 г/кг сырья [60]. Дальнейшее увеличение количества ферментного препарата в реакционной смеси является нецелесообразным с экономической точки зрения, поскольку существенной разницы в увеличении эффективности гидролитического расщепления белковых молекул не наблюдается.

#### 4.2. Автолиз ферментного препарата

Автолиз ферментов, т.е. способность к саморазрушению, - процесс, приводящий к изменению их структуры и физико-химических свойств. Следовательно, он может оказывать влияние на активность ферментного препарата, в состав которого входят данные ферменты, и на эффективность гидролиза белоксодержащего субстрата.

На рис. 4.14 приведена зависимость изменения активности ферментного препарата гепатопанкреатина и оптической плотности продуктов его автолиза. Оптическую плотность измеряли при длине волны 280 нм. Автолиз проводили в течение 3 часов при температуре 50 °с.

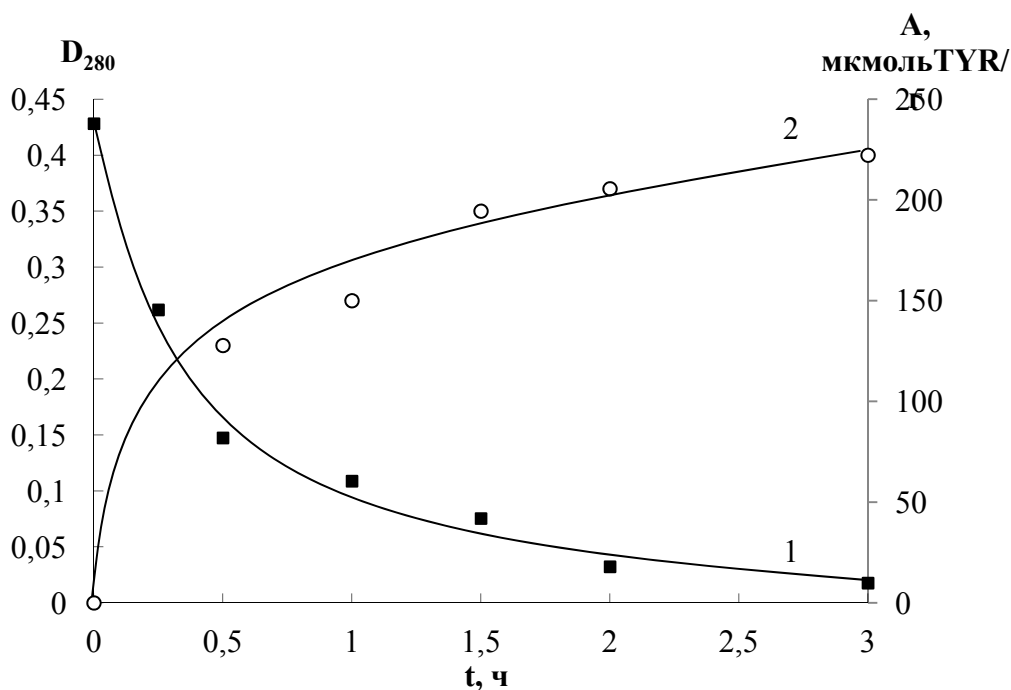


Рис. 4.14. Изменение протеолитической активности гепатопанкреатина (1) и оптической плотности его раствора (2) при автолизе. Условия автолиза:  $T = 50^{\circ}\text{C}$ ,  $C_{\text{фп}} = 1 \text{ мг/мл}$ ,  $t = 3 \text{ часа}$

Из рисунка видно, что в процессе автолиза в течение первого часа инкубации протеолитическая активность ферментного препарата резко уменьшается. При этом наблюдается пропорциональное увеличение оптической плотности ( $d_{280}$ ) раствора гидролизата, что свидетельствует о том,

что ферментный препарат легко гидролизует собственные молекулы, как и молекулы любого другого белка. После 2 часов изменение оптической плотности незначительно. Это связано с тем, что при автолизе концентрация ферментного препарата в растворе уменьшается или происходит его дезактивация при температуре инкубации.

На рис. 4.15 представлена зависимость изменения активности ферментного препарата и степени гидролиза белков тканей трески в процессе гидролиза.

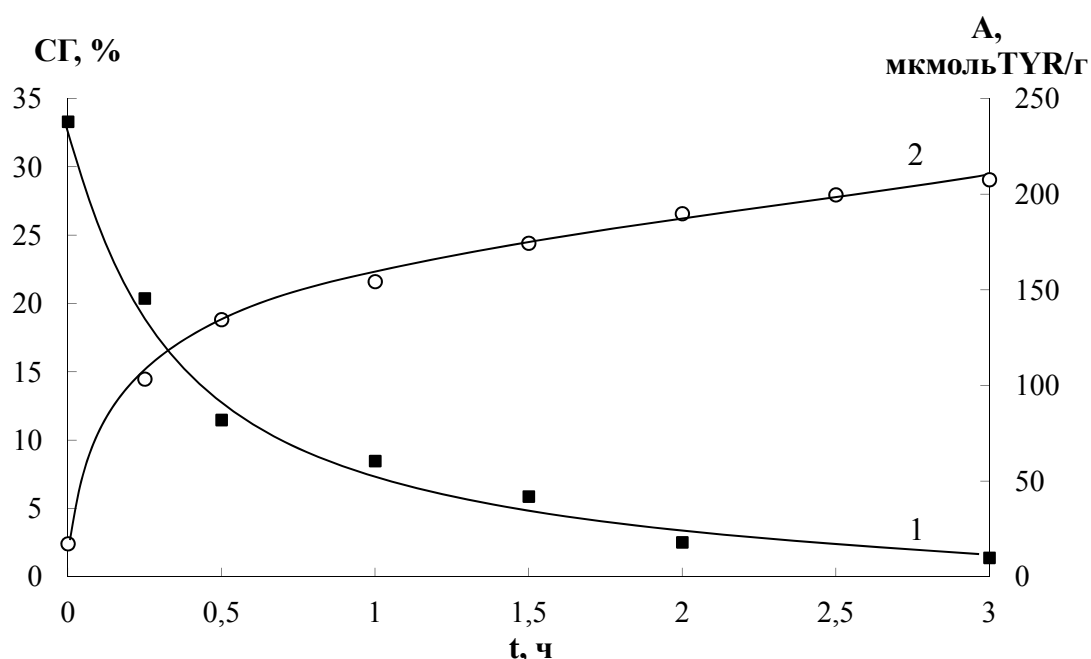


Рис. 4.15. изменение во времени протеолитической активности ферментного препарата гепатопанкреатина (1) и степени гидролиза белков тканей трески (2). Условия гидролиза:  $T = 50^{\circ}\text{C}$ ,  $C_{\text{фп}} = 1 \text{ мг/мл}$ ,  $t = 3 \text{ часа}$

Из рисунка видно, что при высокой активности ферментного препарата в начальный период наблюдается резкое нарастание степени гидролиза рыбного сырья. После 30 минут, когда активность препарата падает больше, чем в 2 раза, эффективность гидролиза пропорционально снижается, что подтверждается падением его скорости и уменьшением константы скорости гидролиза в 2,5 раза (подробнее об этом см. п. 4.1).

Также в работе исследовали изменение состава ферментного препарата в процессе автолиза. На рис. 4.16 представлена электрофореграмма образцов

водного раствора ферментного препарата, выделенного из гепатопанкреаса камчатского краба ( $C_{\text{фп}} = 6 \text{ г/л}$ ), в разные промежутки времени автолиза.

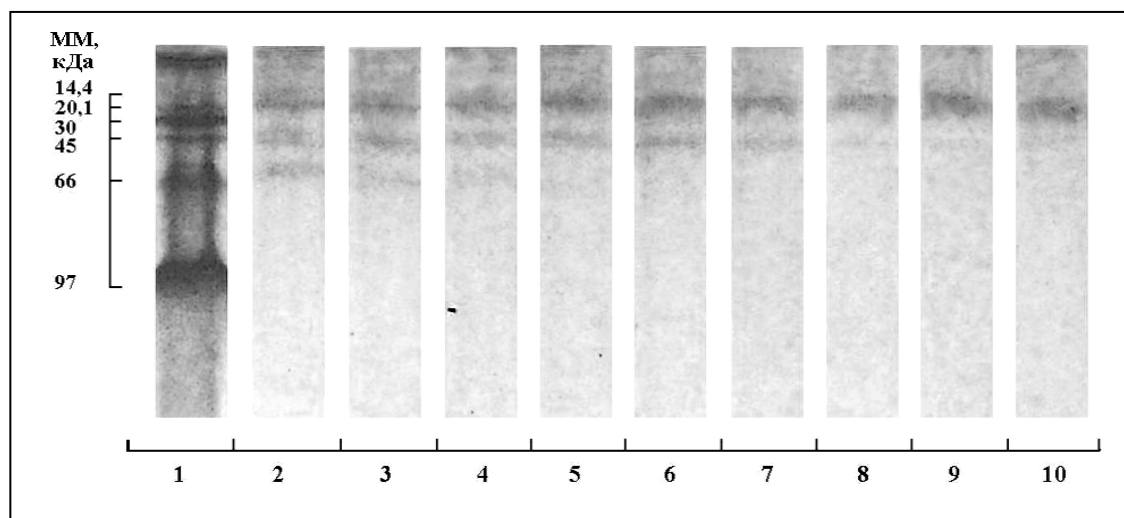


Рис. 4.16. Электрофореграмма белковых веществ, содержащихся в ферментном препарате из гепатопанкреаса камчатского краба: 1 – Стандартные маркеры (*Pharmacia Biotech*); 2 - 10 – ферментный препарат в разные периоды времени: 5 минут (2), 10 минут (3), 15 минут (4), 20 минут (5), 30 минут (6), 45 минут (7), 60 минут (8), 90 минут (9) и 120 минут (10)

В процессе автолиза в составе ферментного препарата выявлены значительные изменения. Так, на первой минуте автолиза обнаружено три фракции с молекулярными массами 63, 46 и 20 кДа. Однако фракция с молекулярной массой 63 кДа полностью разрушается к 30-й минуте. К концу второго часа автолиза в исследуемом растворе обнаруживается только одна фракция с молекулярной массой 20 кДа.

На рис. 4.17 представлены результаты спектральной обработки электрофореграммы (рис. 4.16) автолиза ферментного препарата, что позволило установить наличие белковых фракций в растворе гепатопанкреатина на разных стадиях автолиза.



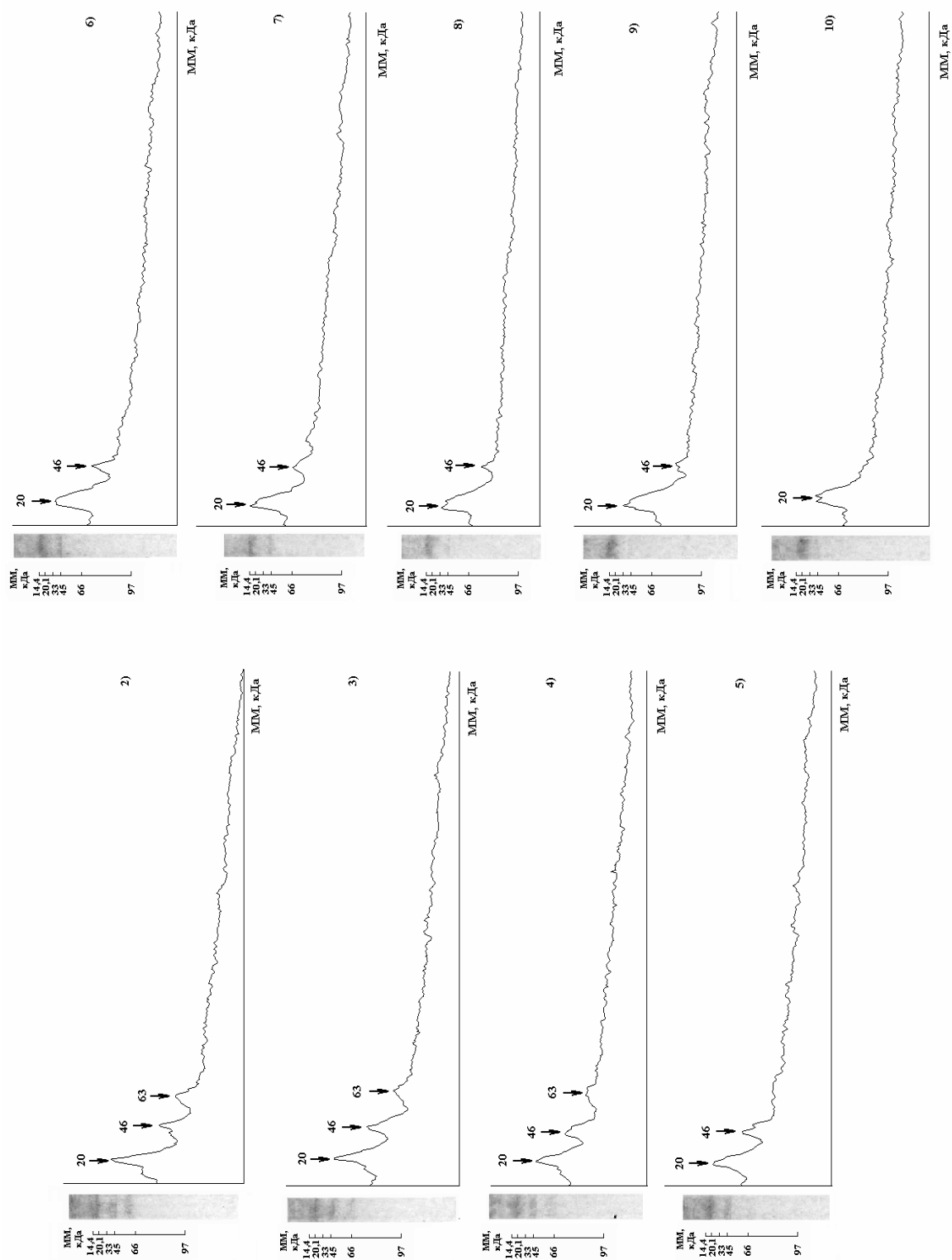


Рис. 4.17. Спектральная обработка электрофореграммы раствора ферментного препарата на разных этапах автолиза (рис. 4.16): 5 минут (2), 10 минут (3), 15 минут (4), 20 минут (5), 30 минут (6), 45 минут (7), 60 минут (8), 90 минут (9) и 120 минут (10)

По результатам исследования установлено, что протеолитические ферменты, входящие в состав ферментного препарата гепатопанкреатина, разрушаются в процессе автолиза, что приводит к падению активности данного препарата, и, соответственно, к уменьшению скорости расщепления белковых молекул при гидролизе.

### **4.3. Эффект способа внесения фермента**

Проведенные исследования показали, что реакция протеолитического расщепления белковых молекул ферментным препаратом, выделенным из гепатопанкреаса камчатского краба, достигает своего насыщения к 3-4 часу, Это связано, во-первых, с ингибированием ферментов продуктами гидролиза, а во-вторых, со снижением активности ферментов, входящих в состав данного препарата в результате автолиза.

Чтобы поддержать протеолитическую активность ферментного препарата в данной работе предложен модифицированный способ проведения ферментативного гидролиза, который отличается от традиционного тем, что ферментный препарат вносится в реакционную смесь многократно, через каждые полчаса в течение первых трех часов.

В ходе работы получены гидролизаты двумя способами, отличающимися способом внесения в реакционную смесь ферментного препарата:

- традиционным способом, предусматривающим однократное внесение ферментного препарата в начале процесса гидролиза;
- модифицированным способом, при котором ферментный препарат вносится в реакционную смесь многократно каждые полчаса в течение первых трех часов гидролиза.

На рис. 4.18 представлена зависимость содержания аминного азота в растворах гидролизатов трески от времени при разных способах внесения ферментного препарата.

Установлено, что при многократном внесении ферментного препарата в реакционную смесь наблюдается увеличение нарастания аминного азота в

гидролизате по сравнению с традиционным способом, предполагающим добавление ферментного препарата однократно. Так, по истечении трех часов при многократном внесении ферментного препарата концентрация аминного азота составляет 7,6 г/л, тогда как при однократном – всего 5,3 г/л. По истечении 6 часов гидролиза эти значения составляют 9,4 и 6,6 г/л соответственно.

Максимальная степень гидролиза белков тканей трески, которая может быть достигнута за 6 часов при однократном добавлении ферментного препарата, составляет 50,7 %, при многократном – 55-60 %.

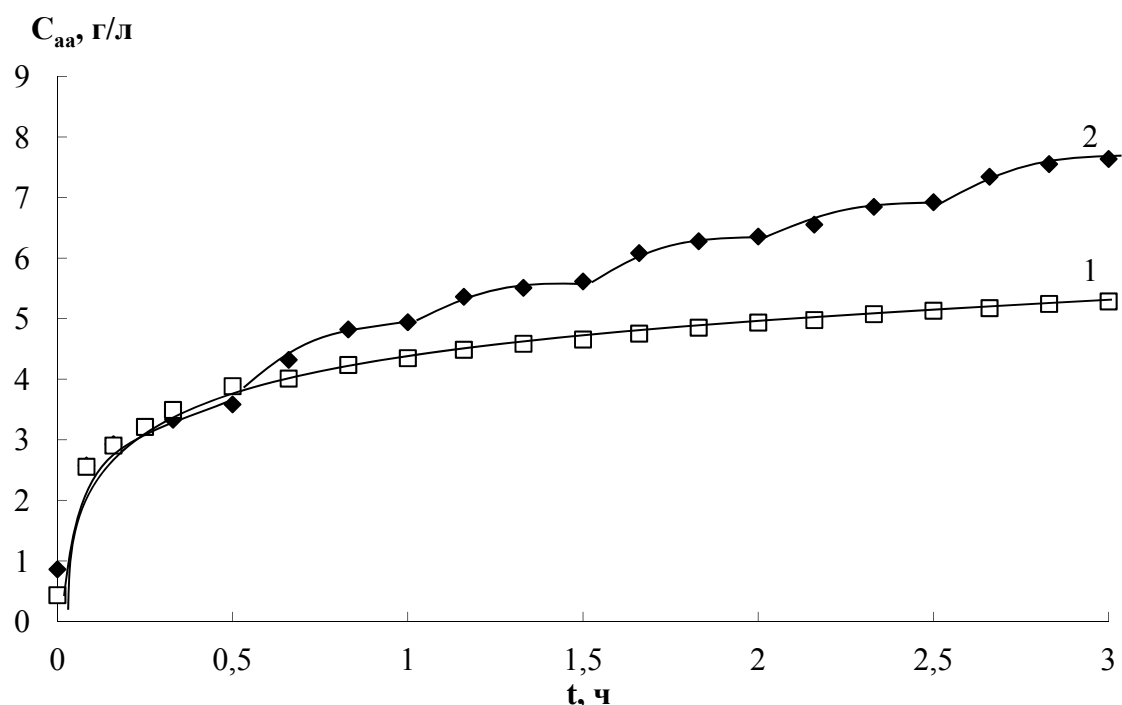


Рис. 4.18. Зависимость содержания аминного азота в гидролизате трески от времени при разных условиях проведения гидролиза: 1 – однократное внесение ферментного препарата; 2 – многократное внесение ферментного препарата.  $C_{фп} = 6$  г/кг сырья

На рисунке 4.19 представлены кинетические кривые ферментативного гидролиза тканей трески при разных условиях проведения гидролиза (рис. 4.18), построенные в координатах уравнения 4.3 и разбитые на «быструю» и «медленную» стадии.

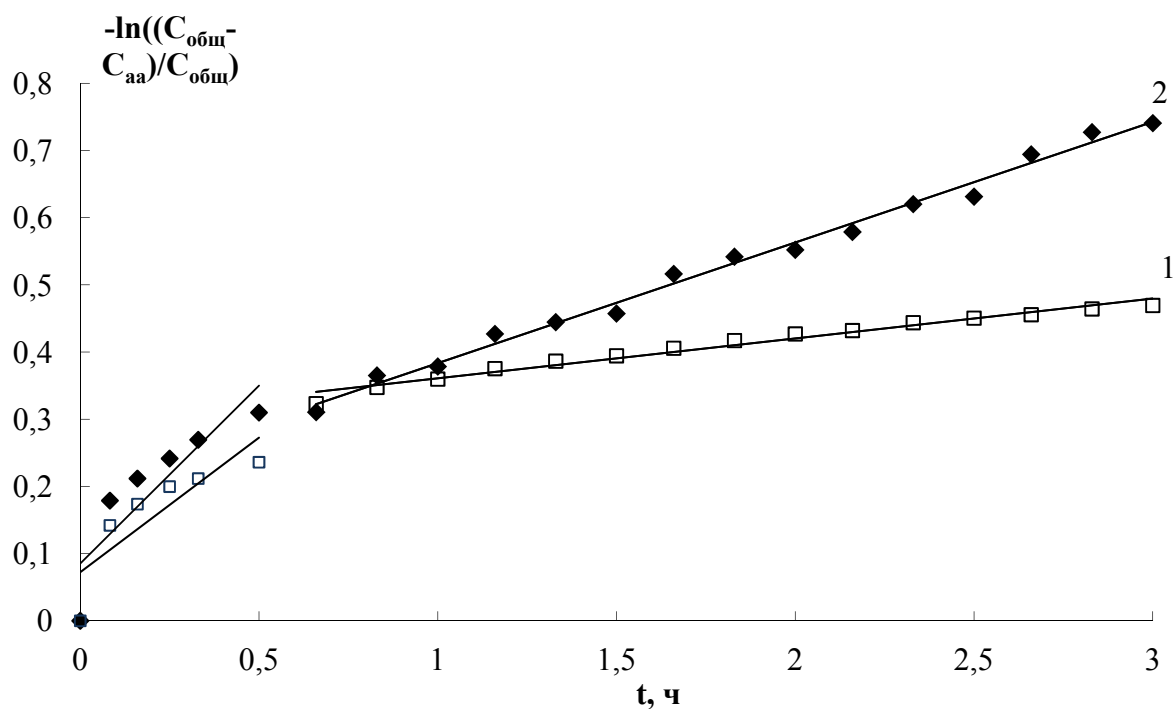


Рис. 4.19 Кинетические кривые ферментативного гидролиза трески разделенные на «быструю» и «медленную» стадии.  $C_{\text{фп}} = 6$  г/кг сырья. Ферментный препарат гепатопанкреатин вносили в реакцию смесь однократно (1) и многократно (2).

Анализ кинетических кривых выявил неточную аппроксимацию «медленной» стадии как единого отрезка (рис. 4.19, кривая 2), что связано со скачкообразным увеличением содержания аминного азота в растворе гидролизата при внесении каждой порции ферментного препарата.

В связи с этим предполагается, что данный отрезок может быть разделен на несколько более мелких, каждый из которых будет характеризовать отдельную стадию процесса гидролиза при внесении дополнительного количества ферментного препарата (рис. 4.20).

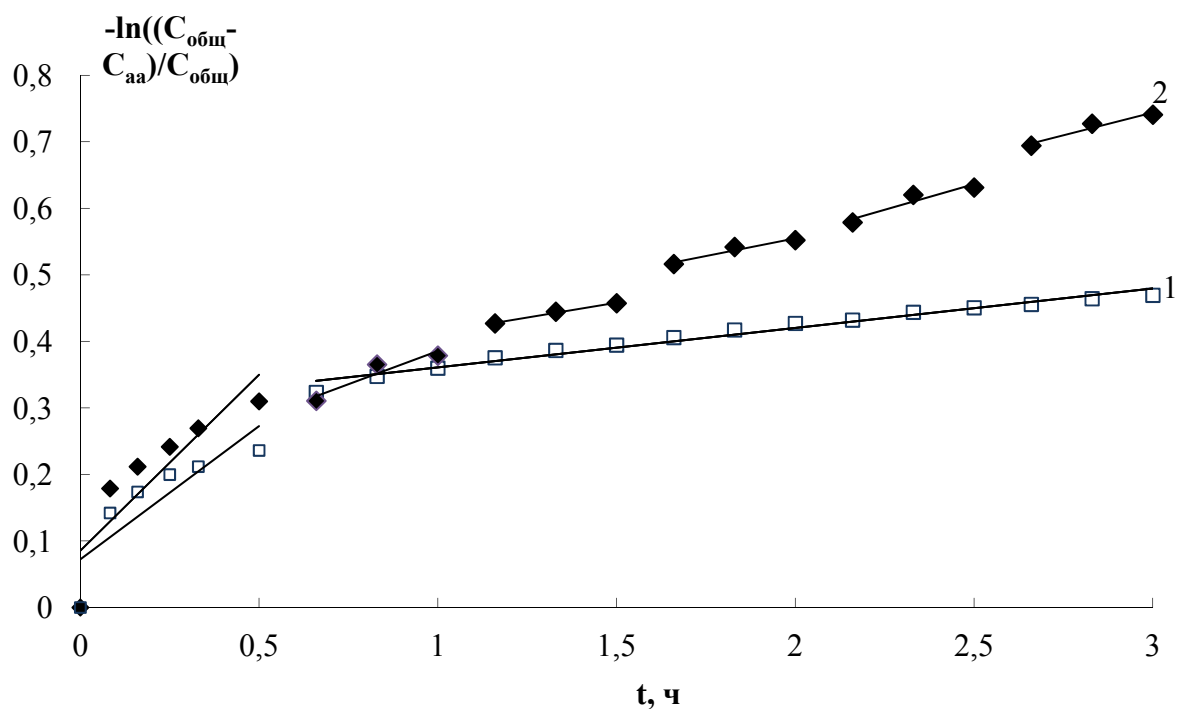


Рис. 4.20 Разделение кинетических кривых ферментативного гидролиза трески разделенные на более мелкие стадии.  $C_{\text{фп}} = 6$  г/кг сырья. Ферментный препарат гепатопанкреатин вносили в реакционную смесь однократно (1) и многократно (2).

Таким образом, содержание аминного азота, а также степень гидролиза у гидролизатов, полученных двумя разными способами, будет существенно различаться. Эта закономерность прослеживается и в том случае, когда концентрация вносимого ферментного препарата изменяется. На рис. 4.21 изображена зависимость содержания аминного азота в растворах гидролизатов от времени при разных способах внесения ферментного препарата. Концентрация ферментного препарата  $C_{\text{фп}} = 3$  г/кг сырья.

Из рис. 4.18 и 4.21 видно, что количество аминного азота в гидролизате, полученном по модифицированной технологии, превышает таковое в гидролизате, произведенном по традиционной схеме с однократным внесением ферментного препарата.

Через 3 часа после начала гидролиза при многократном внесении ферментного препарата концентрация аминного азота в растворе гидролизата составляет 5,8 г/л, тогда как при однократном – 4,8 г/л.

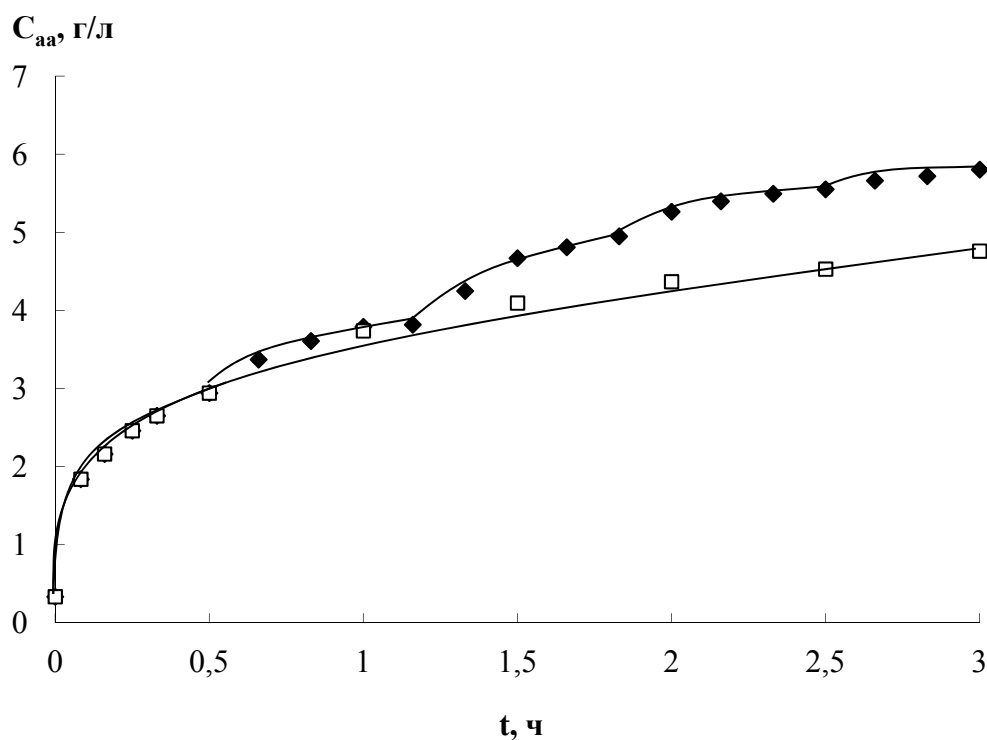


Рис. 4.21. Зависимость содержания аминного азота в гидролизате трески от времени при разных условиях проведения гидролиза: 1 – однократное внесение ферментного препарата; 2 – многократное внесение ферментного препарата.  $C_{фп} = 3$  г/кг сырья

На рисунке 4.22 представлены кинетические кривые ферментативного гидролиза тканей трески при разных условиях проведения гидролиза (рис. 4.21), построенные в координатах уравнения 4.3 и разбитые на «быструю» и несколько более мелких «медленных» стадии.

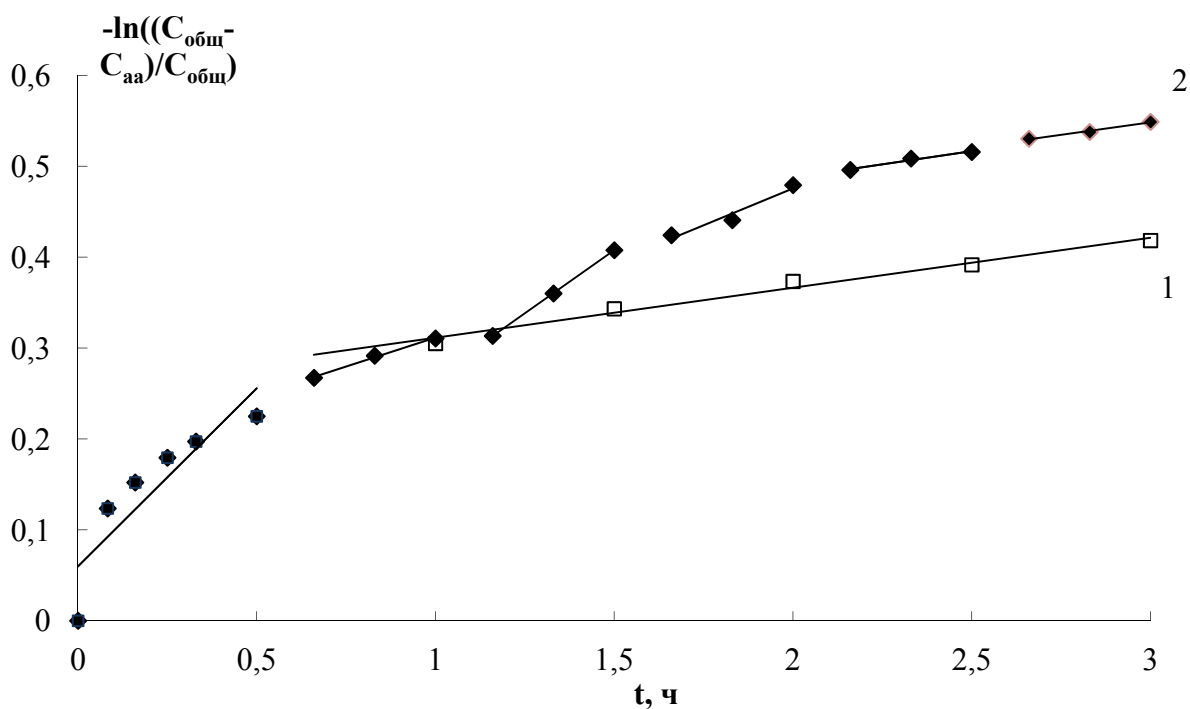


Рис. 4.22 Разделение кинетических кривых ферментативного гидролиза трески разделенные на более мелкие стадии.  $C_{\text{фп}} = 3$  г/кг сырья. Ферментный препарат гепатопанкреатин вносили в реакцию смесь однократно (1) и многократно (2).

В таблице 4.4 приведены константы скорости реакции ферментативного гидролиза сырья трески при однократном и многократном внесении ферментного препарата с разной концентрацией.

Из таблицы видно, что при обеих концентрациях ферментного препарата скорости реакции  $V_1$  будут одинаковы для обоих случаев его внесения в реакцию смесь, а скорости реакции  $V_2$  существенно различаются.

Похожая ситуация возникает при разделении необходимого для гидролиза количества ферментного препарата на порции и добавлении их в реакцию смесь через равные промежутки времени. После внесения каждой последующей порции наблюдается скачок содержания аминного азота в растворе гидролизата. При этом количество образующегося аминного азота выше, чем в случае, когда ферментный препарат вносили в реакцию смесь однократно в начале процесса.

Таблица 4.4

## Скорости реакции ферментативного гидролиза белков тканей трески

$V$	Однократное внесение ФП	Множественное внесение ФП
	$C_{\text{фп}} = 6 \text{ г/кг сырь}$	
$V_1 \cdot 10^4$ (г/л·с)	$1,70 \pm 0,04$	$1,62 \pm 0,02$
$V_2 \cdot 10^4$ (г/л·с)	$0,24 \pm 0,02$	$0,33 \pm 0,01$
	$C_{\text{фп}} = 3 \text{ г/кг сырь}$	
$V_1 \cdot 10^4$ (г/л·с)	$1,74 \pm 0,08$	$1,74 \pm 0,08$
$V_2 \cdot 10^4$ (г/л·с)	$0,37 \pm 0,03$	$0,88 \pm 0,02$

При внесении гепатопанкреатина равными частями на 0 и 30 минуте содержание аминного азота в гидролизате трески через 1,5 часа возрастает на 5% по сравнению с гидролизатом, полученном по традиционной технологии (рис. 4.23). В гидролизате путассу – на 9,5 % (рис. 4.24). На рисунках 4.25 и 4.26 представлены кинетические кривые ферментативного гидролиза трески и путассу при внесении ферментного препарата однократно и частями на 0 и 30 минуте.



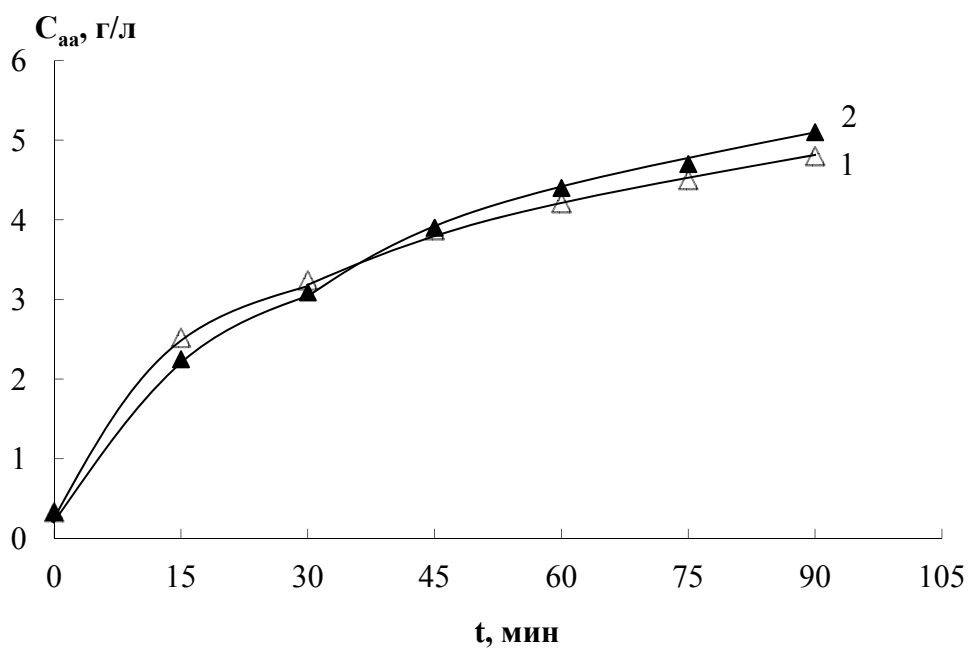


Рис. 4.23. Зависимость содержания аминного азота в гидролизате трески от времени: 1 – однократное внесение 12 г ФП в начале процесса; 2 – внесение ФП частями по 6 г на 0 и 30 минуте. Масса сырья 1 кг

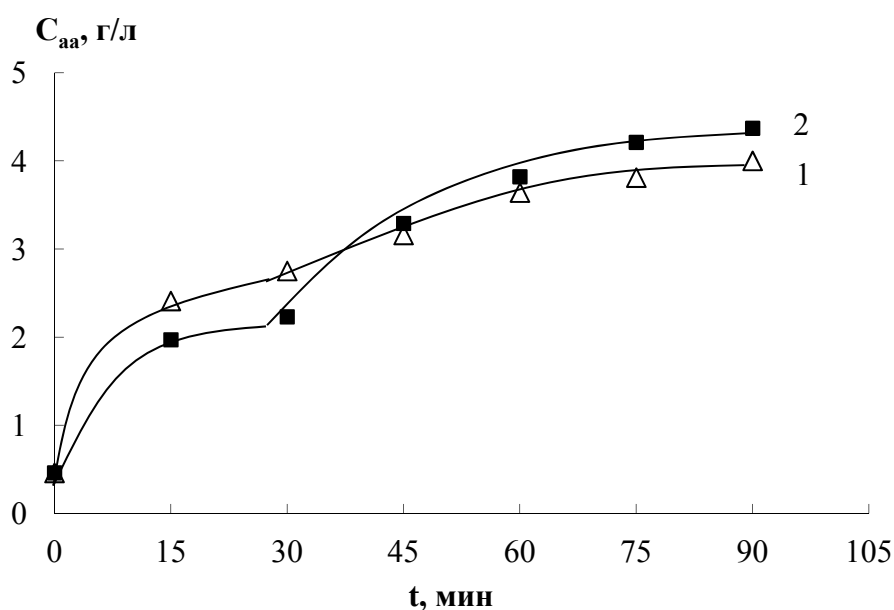


Рис. 4.24. Зависимость содержания аминного азота в гидролизате путассу от времени: 1 – однократное внесение 12 г ФП в начале процесса; 2 – внесение ФП частями по 6 г на 0 и 30 минуте. Масса сырья 1 кг

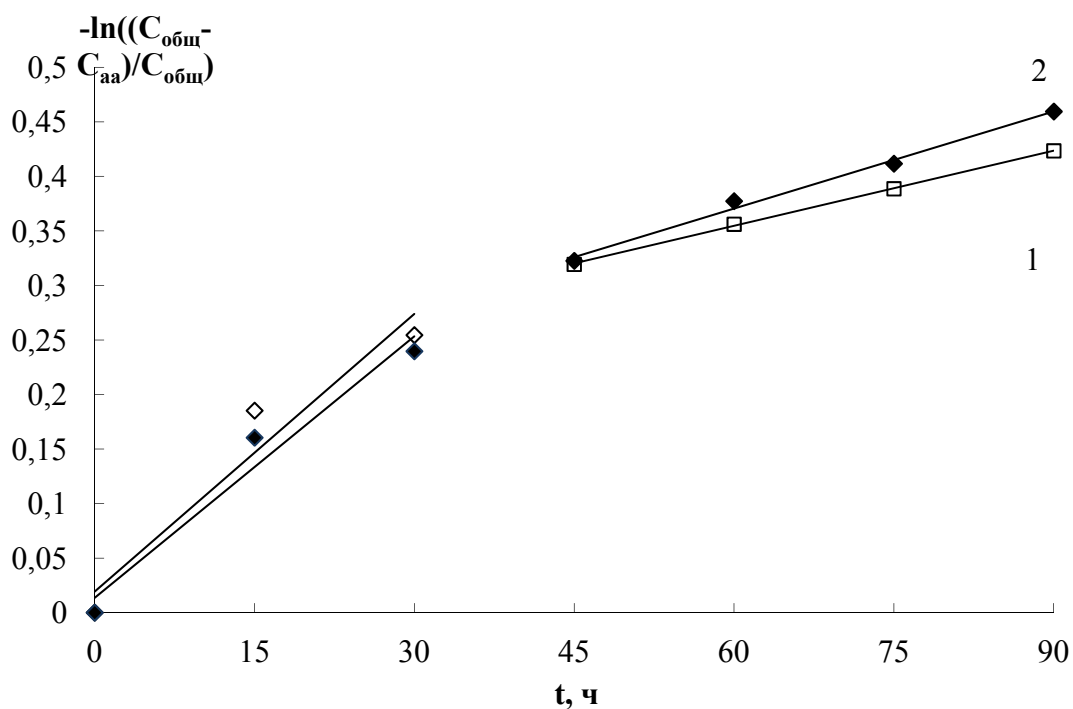


Рис. 4.25. Кинетические кривые ферментативного гидролиза трески 1 – однократное внесение 12 г ФП в начале процесса; 2 – внесение ФП частями по 6 г на 0 и 30 минуте

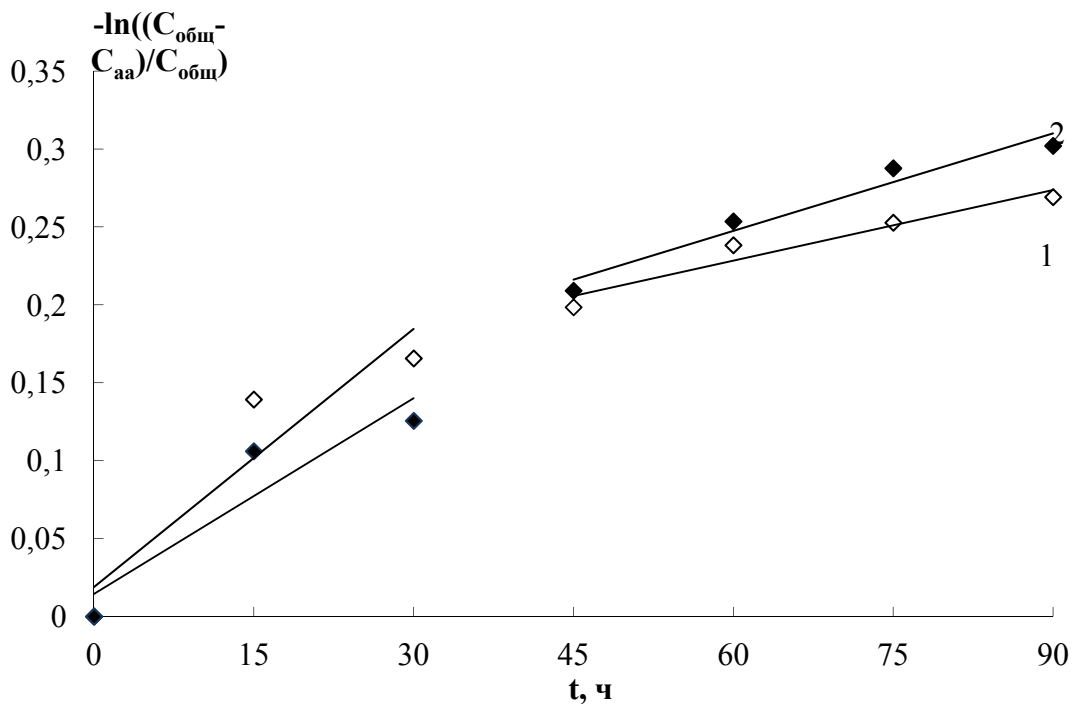


Рис. 4.26. Кинетические кривые ферментативного гидролиза путассу 1 – однократное внесение 12 г ФП в начале процесса; 2 – внесение ФП частями по 6 г на 0 и 30 минуте

Более позднее внесение второй порции ферментного препарата (на 60 минуте) также вызывает рост аминного азота в растворе гидролизата, однако в конечном итоге его количество оказывается немного ниже, чем в первом случае, но при этом все же превышает количество аминного азота в гидролизате, полученном по традиционной технологии с однократным внесением фермента в реакционную смесь (рис. 4.27)

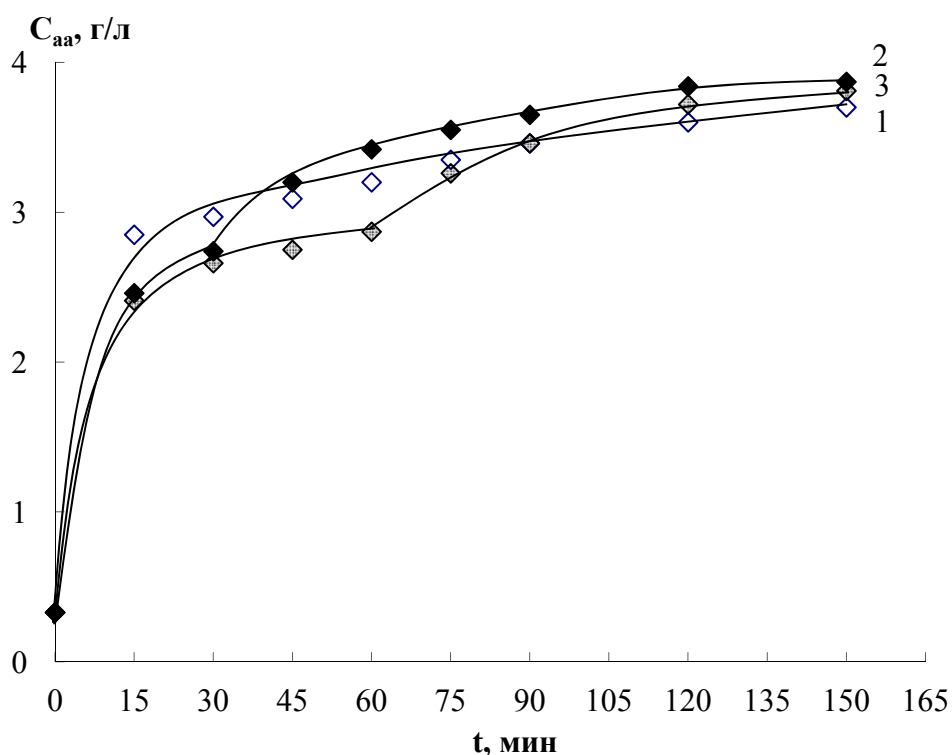


Рис. 4.27. Зависимость содержания аминного азота в гидролизате трески от времени: 1 – однократное внесение 12 г ФП в начале процесса; 2 – внесение ФП частями по 6 г на 0 и 30 минуте; 3 – внесение ФП по 6 г на 0 и 60 минуте. Масса сырья 1 кг

В таблице 4.5 представлены скорости реакции ферментативного гидролиза трески для разных условий внесения ферментного препарата в реакционную смесь. Наибольшая скорость реакции для «быстрой» стадии наблюдается при однократном внесении ФП. Для медленной стадии – при добавлении ферментного препарата на 0 и 60 минуте гидролиза.

Таблица 4.5

Скорости реакции ферментативного гидролиза белков тканей трески.  $C_{\text{ФП}} = 12$  г/кг сырья

$V$	Однократное внесение ФП	Множественное внесение ФП по 6 г на 0 и 30 минуте	Множественное внесение ФП по 6 г на 0 и 60 минуте
$V_1 \cdot 10^5$ (г/л·с)	$0,86 \pm 0,08$	$1,70 \pm 0,07$	$0,39 \pm 0,05$
$V_2 \cdot 10^6$ (г/л·с)	$3,75 \pm 0,05$	$2,11 \pm 0,05$	$2,72 \pm 0,05$

По результатам исследования можно сделать вывод, что применение в технологии получения ферментативных белковых гидролизатов модифицированного способа гидролиза позволяет поддерживать протеолитическую активность ферментного препарата за счет множественного его внесения в реакционную смесь, а, следовательно, получить гидролизаты с более высокой степенью расщепления белков рыбного сырья. С другой стороны подобное изменение традиционной технологии значительно сокращает время гидролиза для достижения необходимой степени расщепления белков.

#### 4.4. Молекулярно-массовое распределение белковых фракций в гидролизате по данным электрофореза

Увеличение концентрации аминного азота в гидролизате, и, соответственно, степени гидролиза хорошо коррелирует с изменением других параметров гидролизата, таких, например, как его молекулярно-массовый состав. На рис. 4.28 изображена электрофореграмма распределения белковых фракций, входящих в состав негидролизованного сырья и гидролизатов, полученных в течение разного времени при однократном внесении ферментного препарата.

Водорастворимая часть негидролизованного сырья (ткани трески), которая подвергалась электрофорезу, представляет собой смесь соединений белковой природы, молекулярная масса которых находится в пределах от 10 до 300 кДа. В процессе гидролиза молекулярная масса белковых фракций в растворе гидролизата изменяется. Гидролитическое расщепление белков сырья начинается с момента внесения ферментного препарата, поэтому уже после 5 минут гидролиза часть белковых веществ, входящих в состав тканей трески, переходит растворимое состояние, и на электрофореграмме наблюдается изменение фракционного состава. После 15 минут в гидролизате можно наблюдать белковые соединения с молекулярной массой до 60 кДа, после 30 минут гидролиза в растворе гидролизата присутствуют только низкомолекулярные вещества (менее 30 кДа).

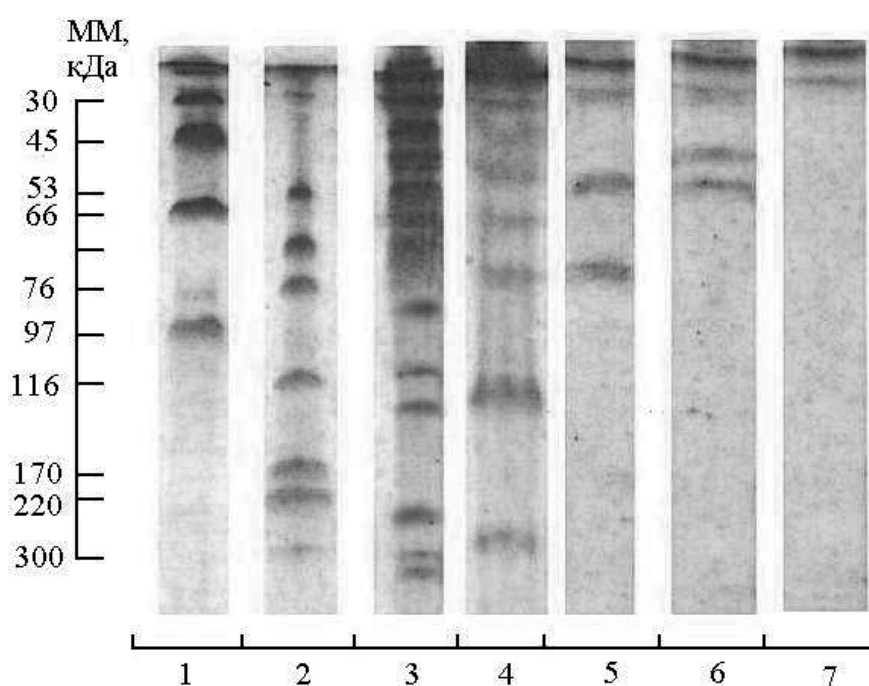


Рис. 4.28. Распределение белковых фракций: 1, 2 – стандартные маркеры (Pharmacia Biotech); 3 – негидролизованное сырье (ткани трески); 4-6 – гидролизат, полученный при разном времени гидролиза: 5 мин (4); 15 мин (5); 30 мин (6); 60 мин (7). ферментный препарат гепатопанкреатин вносили в реакционную смесь однократно,  $C_{\text{фп}} = 6$  г/кг сырья

В таблице 4.6 обобщены результаты распределения белковых фракций, входящих в состав полученных гидролизатов, по молекулярной массе.

Таблица 4.6

Наличие белковых фракций разной молекулярной массы в гидролизатах трески, полученных при разном времени гидролиза

Время гидролиза, мин	Молекулярные массы белковых фракций, кДа				
	10 – 50	50 – 100	100 – 150	150 – 200	Выше 200
0	+	+	-	-	+
5	+	+	+	+	+
15	+	+	-	-	-
30	+	+	-	-	-
60	+	-	-	-	-

С помощью спектральной обработки электрофореграммы (рис. 4.28) определено наличие в составе гидролизата трески фракций белковых соединений с разными молекулярными массами (рис. 4.29).

Анализ полученных экспериментальных данных позволил установить зависимость изменения числа белковых фракций в составе гидролизата трески от времени (рис. 4.30).

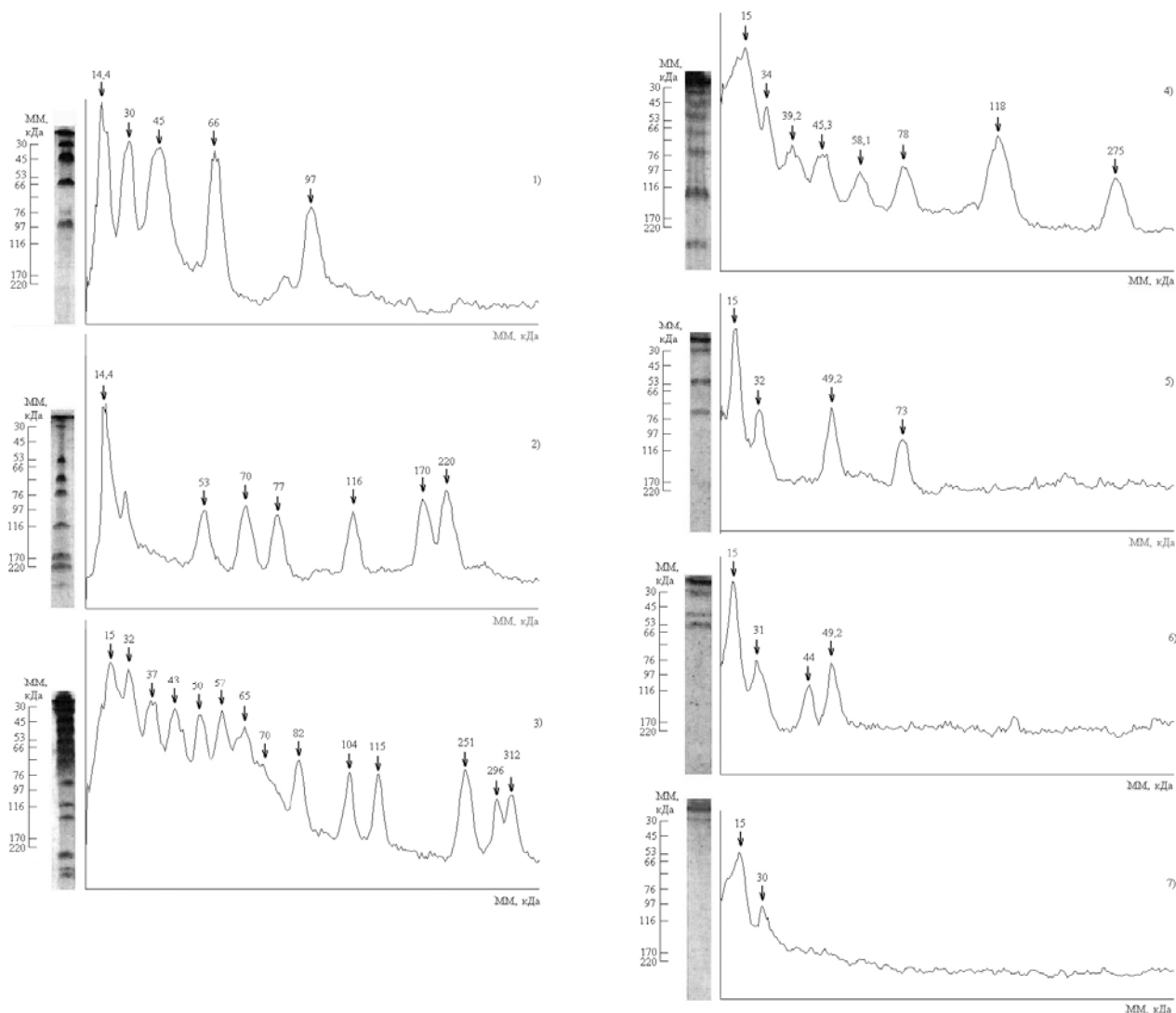


Рис. 4.29. Спектрограмма образцов, разделенных по молекулярным массам методом электрофореза: 1, 2 – стандартные маркеры (Pharmacia Biotech); 3 – негидролизованное сырье (отходы переработки трески); 4-6 – гидролизат, полученный в течение разных промежутков времени: 5 мин (4); 15 мин (5); 30 мин (6); 60 мин (7).  $C_{\text{фп}} = 6 \text{ г/кг сырье}$

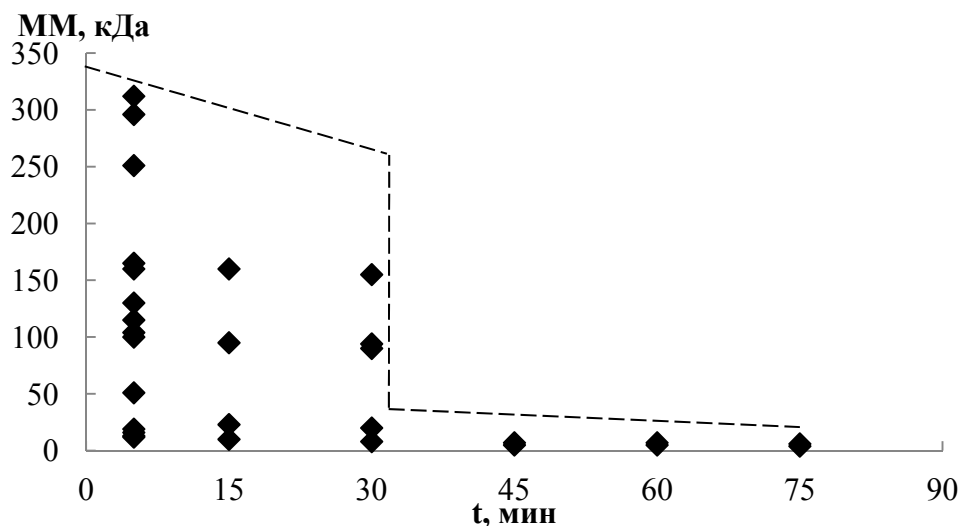


Рис. 4.30. зависимость изменения молекулярно-массового состава гидролизата трески от времени. Ферментный препарат вносили однократно,  $C_{\text{фп}} = 6$  г/кг сырья

На рис. 4.31 приведена электрофореграмма распределения белковых веществ, входящих в состав гидролизатов, полученных по традиционной и модифицированной технологии (при однократном и многократном внесении ферментного препарата в реакцию смесь). Время гидролиза 6 часов.

При сравнении электрофореграмм выявлено наличие в обоих образцах низкомолекулярных белковых фракций с молекулярной массой менее 40 КДа.

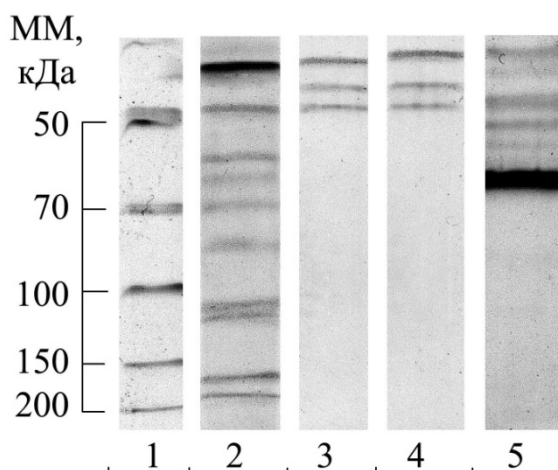


Рис. 4.31. Распределение белковых фракций: 1 - стандартные маркеры; 2 – негидролизованное сырье (ткани трески); 3 – гидролизат, полученный при однократном внесении ФП; 4 - Гидролизат, полученный при многократном внесении ФП; 5 – бычий сывороточный альбумин (приведен для сравнения).  $C_{\text{фп}} = 6$  г/кг сырья, Время гидролиза 6 часов.



#### 4.5. Кинетическая модель ферментативного гидролиза

Первоначально для описания кинетических закономерностей ферментативного гидролиза белоксодержащего сырья использовали модель [102], в соответствии с которой реакция ферментативного гидролиза является реакцией первого порядка. При этом накопление в растворе гидролизата аминного азота происходит в соответствии с выражением 4.3:

$$-\ln([\tilde{N}_{\text{ами}} - \tilde{N}_{\text{ами}0}] - [\tilde{N}_{\text{ам}} - \tilde{N}_{\text{ам}0}]) + \ln[\tilde{N}_{\text{ами}} - \tilde{N}_{\text{ам}0}] = kt$$

где  $[C_{\text{общ}}]$  – концентрация общего азота в растворе гидролизата, г/л;

$[C_{\text{ам}}]$  – концентрация продуктов реакции (аминного азота), г/л;

$[C_{\text{ам}0}]$  – фоновая концентрация аминного азота, г/л;

$t$  – время гидролиза, с.

По предложенной модели определили константы скорости процесса ферментативного гидролиза.

Однако экспериментально показано (см. раздел 4.4), что в процессе реакции ферментативного гидролиза рыбного сырья фермент гепатопанкреатин расходуется, подвергаясь автолизу. Следовательно, реакцию ферментативного гидролиза можно считать реакцией второго порядка. В этом случае ферментативная реакция протекает через ряд промежуточных стадий. На основании полученных экспериментальных данных при изучении кинетики гидролиза в данной работе предлагается упрощенный механизм ферментативного гидролиза, включающий три реакции:

1) Взаимодействие молекулы фермента ( $E$ ) с молекулой легко расщепляемого субстрата ( $S$ ) с образованием продукта гидролиза ( $P$ ) и восстановлением молекулы фермента ( $E$ ):



2) Взаимодействие молекулы фермента ( $E$ ) с молекулой трудно расщепляемого субстрата ( $C$ ) с образованием продукта гидролиза ( $P$ ) и восстановлением молекулы фермента ( $E$ ):



3) Взаимодействие молекулы фермента ( $E$ ) с другой молекулой фермента ( $E$ ) с образованием продукта гидролиза ( $P$ ) и восстановлением молекулы фермента ( $E$ ):



Во всех реакциях продукт гидролиза считается одинаковым, так как он представляет собой гидролизованный белок и регистрируется по накоплению аминного азота в гидролизате.

Реакция (2) введена, исходя из экспериментально полученных кинетических кривых гидролиза (рис. 4.18 и 4.21). На кривых обнаружен начальный участок с высокой скоростью образования продуктов гидролиза, и участок более медленного нарастания аминного азота. При добавлении новых порций фермента видно, что скорость гидролиза снижается по сравнению с начальной скоростью  $V_{max}$ . Поэтому сделано предположение, что субстрат состоит из, по крайней мере, двух групп белков, имеющих различную устойчивость к действию фермента: легко расщепляемые и трудно расщепляемые (например, коллаген).

Реакция (3) учитывает дезактивацию фермента вследствие автолиза (рис. 4.15).

Реакции образования промежуточных соединений не учитываются с целью упрощения предлагаемого механизма. Это дает возможность получения

аналитического решения системы дифференциальных уравнений, описывающих введение ферментного препарата в реакционную смесь многократно через равные интервалы времени, а также расход ферментного препарата вследствие его автолиза.

Система дифференциальных уравнений имеет следующий вид:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{d}{dt} s(t) = -k_1 e(t) s(t), \\ \frac{d}{dt} c(t) = -k_2 e(t) c(t), \\ \frac{d}{dt} e(t) = -k_3 e(t)^2, \\ \frac{d}{dt} p(t) = k_1 e(t) s(t) + k_2 e(t) c(t) + k_3 e(t)^2 \end{array} \right. \quad (4.7)$$

Решением системы являются следующие выражения:

$$s(t) = S_0 \left( \frac{1}{E_0} \right)^{\frac{k_1}{k_3}} e^{-\frac{k_1 \ln \left( k_3 t + \frac{1}{E_0} \right)}{k_3}}; \quad (4.9)$$

$$c(t) = C_0 \left( \frac{1}{E_0} \right)^{\frac{k_2}{k_3}} e^{-\frac{k_2 \ln \left( k_3 t + \frac{1}{E_0} \right)}{k_3}}; \quad (4.10)$$

$$e(t) = \frac{1}{k_3 t + \frac{1}{E_0}}; \quad (4.11)$$

$$p(t) = -S_0 \left( \frac{1}{E_0} \right)^{\frac{k_1}{k_3}} e^{-\frac{k_1 \ln \left( k_3 t + \frac{1}{E_0} \right)}{k_3}} - C_0 \left( \frac{1}{E_0} \right)^{\frac{k_2}{k_3}} e^{-\frac{k_2 \ln \left( k_3 t + \frac{1}{E_0} \right)}{k_3}} - \frac{1}{k_3 t + \frac{1}{E_0}} + C_0 + S_0 + E_0 + P_0 \quad (4.12)$$

при условии, что

$$e(0) = E_0, \quad s(0) = S_0, \quad c(0) = C_0, \quad p(0) = 0.$$

Полученные аналитические выражения используют для расчета констант ( $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_3$ , и  $S_0$ ) реакции ферментативного гидролиза с использованием программы *Excel*. При расчетах используют условные значения концентраций субстрата и фермента в относительных единицах:

- концентрация субстрата  $[S] + [C] = 1$ .
- начальная концентрация фермента  $[E] = 0.06$  (из соотношения фермента и субстрата).

Количество легко расщепляемого субстрата рассчитывают путем оптимизации, а количество трудно расщепляемого определяли как разность  $[C] = 1 - [S]$ .

В результате расчетов, произведенных по данной модели, были определены константы скорости реакции ферментативного гидролиза белков, содержащихся в тканях трески при однократном и многократном внесении ферментного препарата (рис. 4.18) (Таблица 4.7):

Таблица 4.7

Константы скорости реакции ферментативного гидролиза тканей трески  
( $k$ , моль<sup>-1</sup>·л·мин<sup>-1</sup>)

$k_1$	$5,3 \cdot 10^{-2}$
$k_2$	$1,5 \cdot 10^{-3}$
$k_3$	$2,8 \cdot 10^{-2}$

Расчетные графики изменения концентраций всех компонентов и экспериментальные точки, характеризующие концентрацию продуктов гидролиза в разные моменты времени, представлены на рис. 4.32 и 4.33.

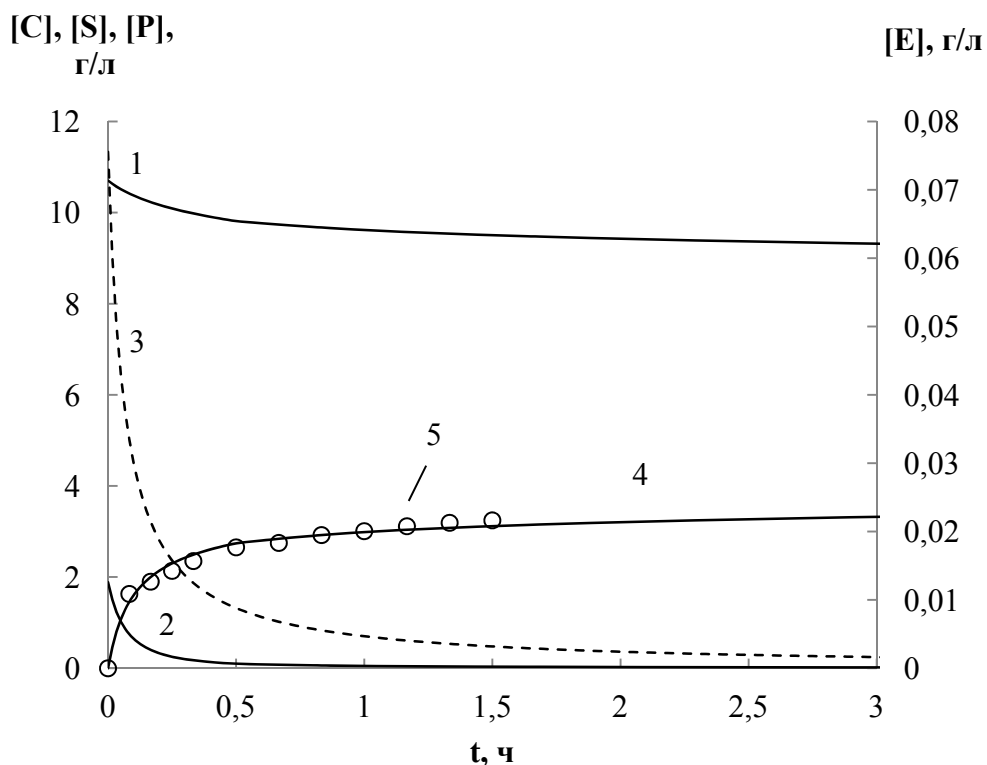


Рис. 4.32. Изменение концентраций компонентов реакционной смеси при однократном добавлении ФП: 1 – труднорасщепляемый субстрат; 2 – легкорасщепляемый субстрат; 3 – ферментный препарат; 4 – продукты реакции (теоретические данные); 5 – продукты реакции (экспериментальные данные)

Из данных, приведенных на рис. 4.32 видно, что в первые 30 минут одновременно с накоплением в реакционной смеси продуктов гидролиза, происходит резкое уменьшение протеолитической активности ферментного препарата, вызванное автолизом и температурной инактивацией. Таким образом, однократное внесение ферментного препарата не обеспечивает гидролиз всего белоксодержащего сырья, о чем свидетельствует высокое содержание труднорасщепляемого субстрата.

При многократном добавлении ферментного препарата (рис. 4.33) его протеолитическая активность поддерживается на протяжении всего технологического процесса. Это повышает эффективность процесса ферментативного гидролиза, способствуя разрушению труднорасщепляемого субстрата и увеличению выхода продуктов реакции.

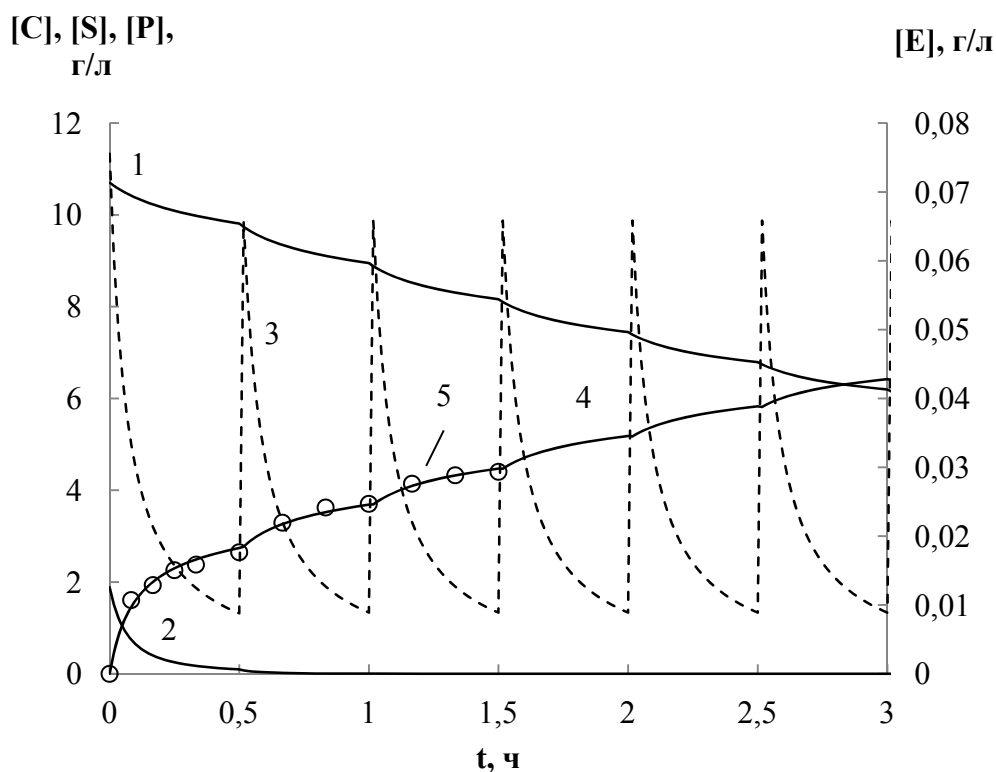


Рис. 4.33. Изменение концентраций компонентов реакционной смеси при многократном добавлении ФП: 1 – труднорасщепляемый субстрат; 2 – легкорасщепляемый субстрат; 3 – ферментный препарат; 4 – продукты реакции (теоретические данные); 5 – продукты реакции (экспериментальные данные)

В обоих случаях предложенная математическая модель с высокой достоверностью описывает процессы, происходящие в реакционной смеси на каждой стадии гидролиза. При этом в ней учитывается расход ферментного препарата в процессе автолиза и снижение его активности в следствие температурной инактивации.

Полученная модель позволила рассчитывать количественные параметры гидролиза при различных количествах вносимого ферментного препарата. Схемы внесения ферментного препарата и результаты расчетов параметров гидролиза приведены в таблице 4.8.

При одинаковом общем количестве ферментного препарата, взятом для гидролиза, схемы с многократным добавлением ферментного препарата (2, 3 и 4) приводят к значительному увеличению концентрации аминного азота по сравнению с однократным использованием ферментного препарата (схема 1).

Схемы 5 и 6 показывают расчетные результаты при использовании 12-ти кратного количества ферментного препарата вносимого разными способами. Схема 6 иллюстрирует случай, который применялся в настоящей работе для исследования кинетики.

Таблица 4.8

Концентрация аминного азота в гидролизате, рассчитанная по разным технологическим схемам

№ схемы	$\Delta C_{\text{фп}}$ , г/кг	n	$\Delta t$ , ч	$C_{\text{фп общ}}$ , г/кг	$C_{\text{аа}}$ , г/л	СГ, %
1	6	1	6	6	3,51	28,1
2	2	3	2	6	4,74	38,0
3	1	6	1	6	4,78	38,2
4	0,5	12	0,5	6	4,59	36,7
5	72	1	6	72	5,46	43,7
6	6	12	0,5	72	9,00	72,0

$\Delta C_{\text{фп}}$  – количество ферментного препарата в каждой порции, г/кг сырья;  $C_{\text{фп общ}}$  – общее количество ферментного препарата, взятого на гидролиз, г/кг сырья; n – количество порций добавляемого ферментного препарата;  $\Delta t$  – периодичность добавления ферментного препарата в течение гидролиза, ч.

О достоверности расчетов, произведенных по данной модели, свидетельствует совпадение экспериментальных и теоретических кривых накопления продуктов реакции.

Таким образом, модель может быть использована для изучения кинетических параметров ферментативного гидролиза и при разработке технологий получения ферментативных белковых гидролизатов для подбора оптимального способа внесения ферментного препарата в реакционную смесь.

Предполагается, что по своим коллоидно-химическим свойствам гидролизаты, полученные по усовершенствованной технологии, в большей степени подойдут для использования их в качестве основы для микробиологических питательных сред по сравнению с гидролизатами, полученными по традиционной технологии.

#### **4.6. Определение технологических параметров, близких к оптимальным, при ферментативном гидролизе белоксодержащего рыбного сырья**

Условия проведения ферментативного гидролиза во многом влияют на коллоидно-химические свойства ферментативных белковых гидролизатов, а также на их физико-химические характеристики, от которых непосредственно зависит качество гидролизатов, а также возможность их практического применения.

При оценке возможности использования гидролизатов в качестве микробиологических питательных сред необходимо учитывать такие параметры как массовая доля влаги в гидролизате, содержание хлорида натрия, рН и степень гидролиза, характеризующая степень расщепления белковых макромолекул исходного сырья. Все эти параметры зависят от условий проведения гидролиза, концентрации ферментного препарата, степени очистки и др.

При моделировании процесса получения ферментативных белковых гидролизатов из отходов рыбопереработки было использовано центральное ортогональное композиционное планирование, полнофакторный эксперимент. В качестве функции отклика была выбрана степень гидролиза, которая определялась как соотношение аминного и общего азота.

В качестве влияющих факторов были выбраны продолжительность гидролиза  $x_1$ , час, и концентрация ферментного препарата  $x_2$ , г/кг сырья.

Предварительные эксперименты показали, что оптимальная концентрация ферментного препарата в растворе гидролизата составляет 5-7 г/кг сырья. Наибольшая степень гидролиза достигается через 5-7 часов и в дальнейшем практически не изменяется.

Область факторного пространства ограничивалась следующим образом:  $x_1$  от 0,5 до 6,5 часов,  $x_2$  от 1 до 7 г/кг сырья.

Остальные параметры, влияющие на качество ферментативного белкового гидролизата (гидромодуль, рН реакционной среды, вид сырья) поддерживались



в ходе эксперимента на постоянном уровне с целью исключения их влияния на результат.

План полнофакторного планирования эксперимента по определению оптимальных технологических режимов ферментативного гидролиза гепатопанкреатином приведен в таблице 4.9.

Таблица 4.9

## Основные характеристики плана экспериментов

Характеристика	Продолжительность гидролиза $x_1$ , час	Концентрация ферментного препарата $x_2$ , г/кг сырья
Основной уровень	3,5	4
Интервал варьирования	3,0	3
Верхний уровень	6,5	7
Нижний уровень	0,5	1

Матрица планирования и результаты эксперимента для ферментативного белкового гидролизата трески представлены в таблице 4.10.

Таблица 4.10

## Матрица планирования и результаты эксперимента

№ Опыта	$x_1$	$x_2$	$x_1$ , час	$x_2$ , г/кг сырья	$x_1 \cdot x_2$	$x_1^2$	$x_2^2$	$Y$ , %
1	-1	-1	0,5	1	0,5	0,25	1	16,6
2	+1	-1	6,5	1	6,5	42,25	1	25,5
3	-1	+1	0,5	7	3,5	0,25	49	31,0
4	+1	+1	6,5	7	45,5	42,25	49	51,0
5	+1	0	6,5	4	26	42,25	16	40,2
6	-1	0	0,5	4	2,0	0,25	16	25,7
7	0	+1	3,5	7	24,5	12,25	49	43,5
8	0	-1	3,5	1	3,5	12,25	1	25,0
9	0	0	3,5	4	14	12,25	16	38,6

Математическая обработка результатов была проведена с использованием стандартной компьютерной программы DataFit ver 8.1.

В результате обработки данных было получено уравнение регрессии процесса ферментативного гидролиза отходов переработки трески:

$$Y = 10,1 + 4,3 \cdot x_1 + 4,6 \cdot x_2 - 0,5 \cdot x_1^2 - 0,3 \cdot x_2^2 + 0,3 \cdot x_1 \cdot x_2^2$$

Адекватность уравнения была роверена при помощи критерия Фишера.

Поверхность функции отклика  $Y$  в зависимости от влияющих факторов представлена на рисунке 4.34.

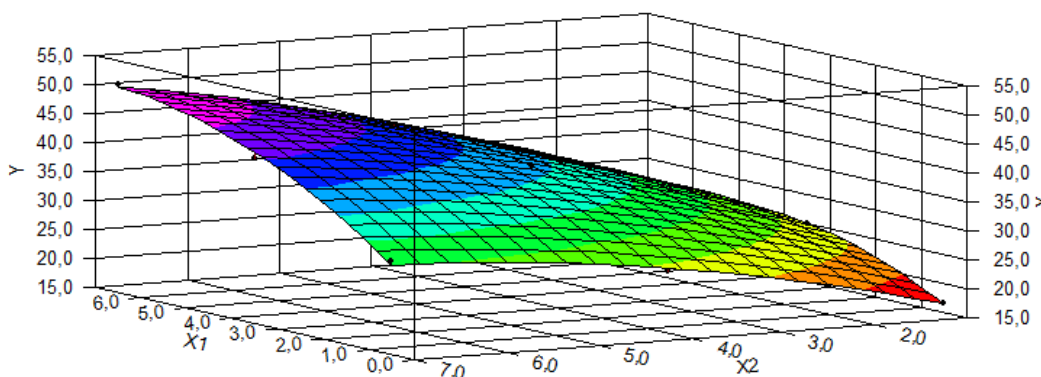


Рис. 4.34. Поверхность функции отклика  $Y$  – степень гидролиза.

Анализ поверхности отклика показал, что оптимум продолжительности процесса ферментативного гидролиза находится при  $x_1 = 6$  часов. Оптимальное количество ферментного препарата  $x_2$  составляет 6 г/кг сырья. Контрольный опыт, поставленный по оптимальным параметрам, подтвердил хорошую сходимость расчетного значения функции отклика (50,8%) и экспериментального значения (51,1%), а, следовательно, и адекватность предложенной модели.

Принимая во внимание изученные параметры процесса ферментативного гидролиза усовершенствованную (модифицированную) технологическую схему получения ферментативного белкового гидролизата можно представить в следующем виде (рис. 4.35):



Рис. 4.35. Схема модифицированной технологии получения ферментативного белкового гидролизата

Полученные данные оптимизации были использованы при разработке технологической инструкции «Получение ферментативного белкового гидролизата из отходов рыбопереработки» (Приложение 2)

## **Глава 5. Коллоидно-химические свойства ферментативных белковых гидролизатов**

Глава посвящена изучению свойств полученных гидролизатов. В ходе работы определено, что кинетические параметры процесса ферментативного гидролиза значительно различаются в зависимости от способа внесения в реакционную смесь ферментного препарата. На основании этого можно предположить, что и коллоидно-химические свойства белковых гидролизатов, полученных разными способами, будут так же различаться. При разработке эффективной технологии производства белковых гидролизатов изучение этих свойств представляет определенный интерес.

В работе проведено сравнение коллоидно-химических свойств ферментативных белковых гидролизатов, полученных традиционным способом (при однократном внесении ферментного препарата гепатопанкреатина в реакционную смесь) и модифицированным способом (при многократном внесении гепатопанкреатина).

### **5.1. Вязкость растворов гидролизатов**

В работе исследована вязкость ферментативных белковых гидролизатов, полученных с использованием ферментного препарата гепатопанкреатина. Результаты измерения вязкости гидролизата трески, полученного при однократном внесении ферментного препарата, представлены на рисунке 5.1.

Наибольшая вязкость гидролизата  $\eta = 21,3 \cdot 10^3 \text{ Па} \cdot \text{с}$  наблюдается в момент начала гидролиза. При увеличении его продолжительности в течение первых 15 минут вязкость падает почти в 50 раз, а затем плавно уменьшается, достигая практически постоянного значения  $\eta = 1,8 \text{ Па} \cdot \text{с}$  через 60 минут. Разрыв кривой изменения вязкости во времени объясняется использованием двух разных методов для определения этого параметра: ротационной и капиллярной вискозиметрии. Резкое снижение этого показателя в начале процесса связано с интенсивным гидролитическим расщеплением белковых макромолекул, обеспечивающих высокую вязкость раствора гидролизата.

В дальнейшем активность ферментного препарата падает, что влечет за собой уменьшение скорости гидролиза и служит причиной того, что вязкость раствора снижается менее интенсивно. Однако в данном случае способ внесения ферментного препарата в реакционную смесь не влияет на вязкость гидролизата, поскольку она активно снижается только в начальный период времени, когда в обоих случаях количество ферментного препарата в растворе одинаково.

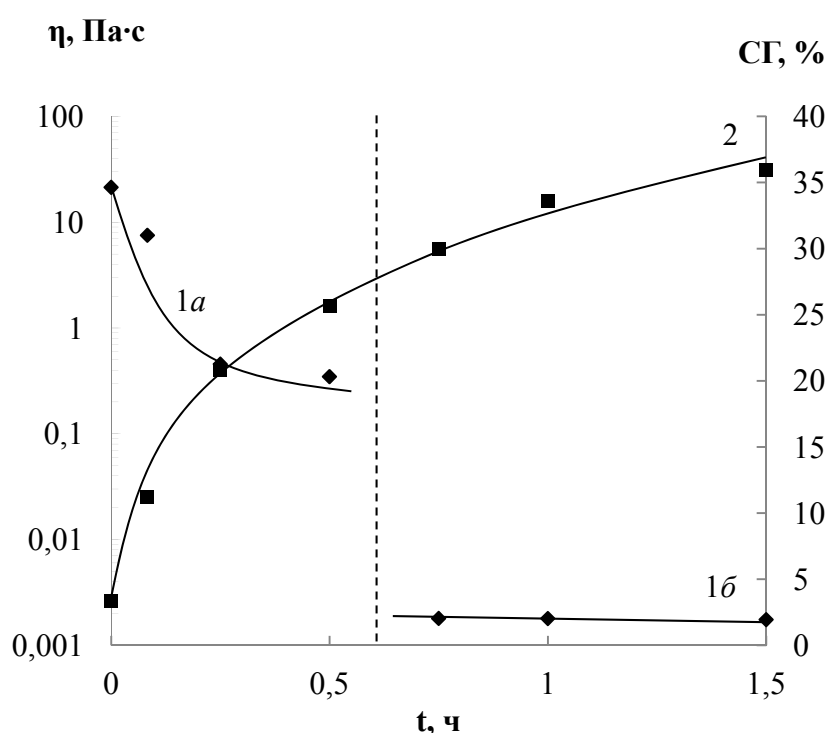


Рис. 5.1. Зависимость вязкости раствора гидролизата трески (кривая 1) и степени гидролиза (кривая 2) от времени. Условия гидролиза: внесение ферментного препарата однократно;  $C_{\text{фп}} = 6 \text{ г/кг сырь}$ ; 1а – метод ротационной вискозиметрии  $\dot{\gamma} = 5,3 \cdot 10^{-2} \text{ с}^{-1}$ ; 1б – капиллярной вискозиметрии  $\dot{\gamma} = 3 \cdot 10^2 \text{ с}^{-1}$

## 5.2. Морфология поверхности и размер частиц

Размер частиц гидролизата – важный параметр, от которого зависит биологическая активность питательных веществ, входящих в его состав, их растворимость при образовании водной дисперсии и усвоение живыми организмами.

Структура поверхности твердых частиц негидролизованного рыбного сырья и полученных из него гидролизатов по данным сканирующей

электронной микроскопии является неоднородной (рис. 5.2). Частицы белка, не подверженного гидролизу, имеют плотную пластинчатую структуру. В процессе гидролиза морфология их поверхности существенно меняется, структура поверхности становится более рыхлой и разнородной.

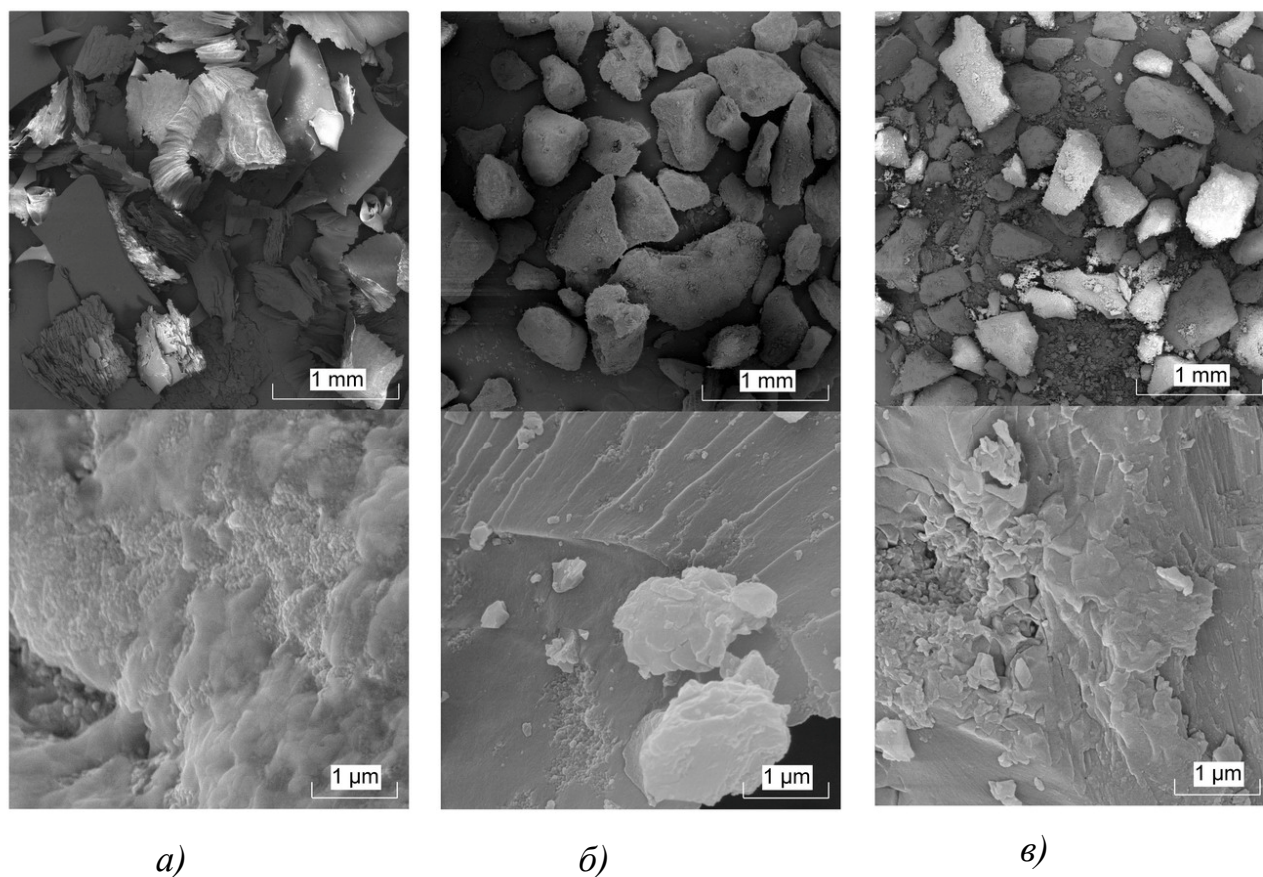


Рис. 5.2. СЭМ-фотографии структуры микрочастиц: *а)* негидролизованного рыбного сырья, *б)* гидролизата, полученного по традиционной технологии, *в)* гидролизата, полученного по модифицированной технологии.

В результате исследования определен размер частиц в водной дисперсии гидролизатов, полученных при гидролизе белков тканей трески при однократном и многократном внесении ферментного препарата, выделенного из гепатопанкреаса камчатского краба. Построены гистограммы распределения частиц по размерам в водной дисперсии гидролизатов (рис. 5.3).

Данные о размере частиц макромолекул в растворе свидетельствуют о том, что в гидролизате, полученном при многократном внесении ферментного препарата, наблюдается наличие фракций размером от 28 до 58 нм, тогда как

размеры частиц макромолекул в гидролизате, полученном при однократном добавлении ферментного препарата, лежат в диапазоне от 190 до 450 нм. В соответствии с выражением 3.10 рассчитан средний диаметр частиц в водном растворе гидролизатов: 324 нм в случае, если гидролизат был получен по традиционной технологии и 41,6 нм – по модифицированной технологии, предполагающей многократное внесение ферментного препарата в реакционную смесь.

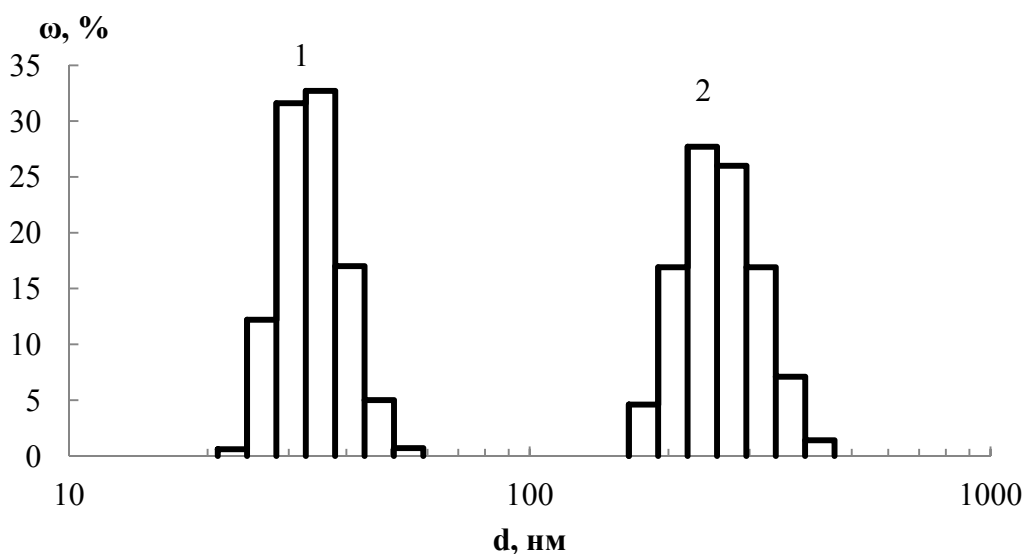


Рис. 5.3. Гистограмма распределения частиц по размерам в водной дисперсии гидролизата трески, полученного при многократном (1) и однократном (2) добавлении ферментного препарата

Наличие в гидролизате, полученном при многократном внесении ферментного препарата, частиц меньшего размера способствует его лучшей растворимости, вследствие чего повышается его биологическая активность по сравнению с гидролизатом, полученным традиционным способом.

### 5.3. Поверхностное натяжение

Ферментативные белковые гидролизаты обладают поверхностно-активными свойствами и могут служить натуральными эмульгаторами и способствовать пенообразованию.

На рис. 5.4. представлена зависимость поверхностного натяжения 10% растворов гидролизатов трески от времени.

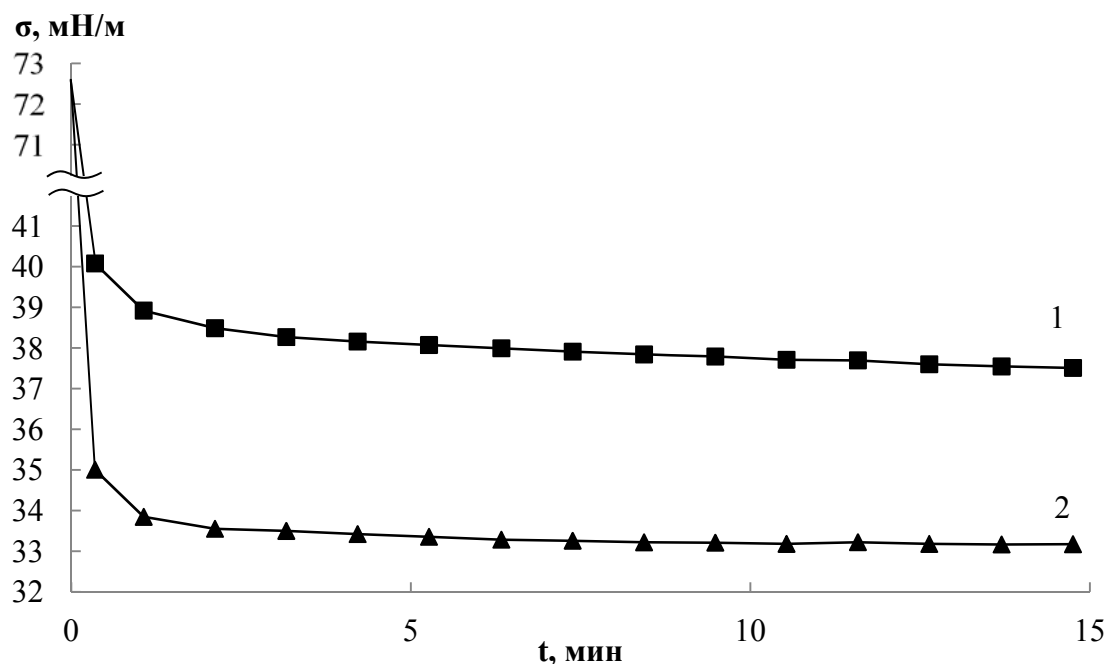


Рис. 5.4. Зависимость поверхностного натяжения 10% растворов гидролизатов трески от времени. Гидролизаты получены при однократном (1) и многократном (2) внесении гепатопанкреатина

При концентрации раствора гидролизата 10% поверхностное натяжение за 15 минут снижается до  $33,1 \pm 0,1$  мН/м (при однократном внесении ферментного препарата – до  $37,5 \pm 0,1$  мН/м). Кроме того поверхностная активность раствора гидролизата, полученного при многократном внесении ферментного препарата ниже, чем при однократном, что свидетельствует о лучшей его способности стабилизировать межфазную поверхность.

#### 5.4. Эмульгирующая способность гидролизатов

Исследована эмульгирующая способность ферментативных белковых гидролизатов в системе «раствор гидролизата – масло». В качестве жировой фазы использовали растительное масло без добавок и консервантов, а также гептан.

По результатам исследования определено, что наиболее ярко эмульгирующую способность проявляет 10%-ный раствор гидролизата,



полученный при многократном внесении ФП в системе «гидролизат - растительное масло». Наибольшая объемная доля стабильной эмульсии достигается при исходной доле жировой фазы 80-90 % и составляет 80-82 % (рис. 5.5). В аналогичной системе при использовании раствора гидролизата, полученного при однократном внесении ФП, наибольшая объемная доля эмульсии также наблюдается при исходной доле растительного масла 80-90 % и составляет 78-80 % (рис. 5.6).

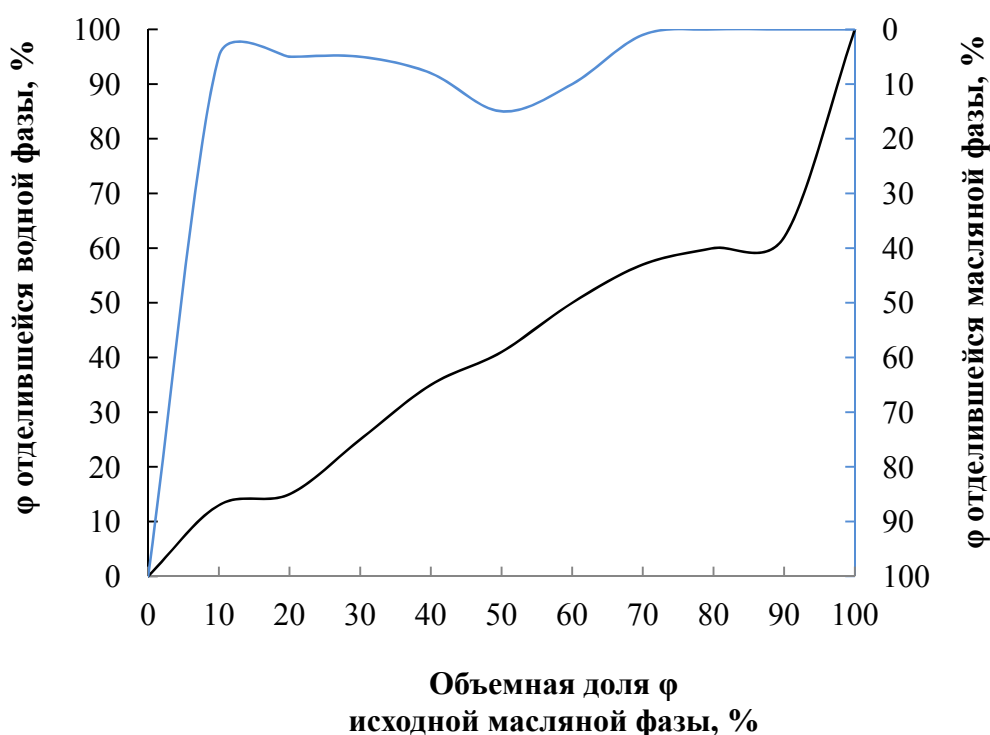


Рис. 5.5. Соотношение объемов фаз в системе «раствор гидролизата - растительное масло» (Использован 10 %-ный раствор гидролизата трески, полученный при однократном внесении ферментного препарата)

При соотношении раствора гидролизата и растительного масла 1:1 объем эмульсии на 20% больше в системе, в которой в качестве стабилизатора использовали гидролизат, полученный по модифицированной схеме.

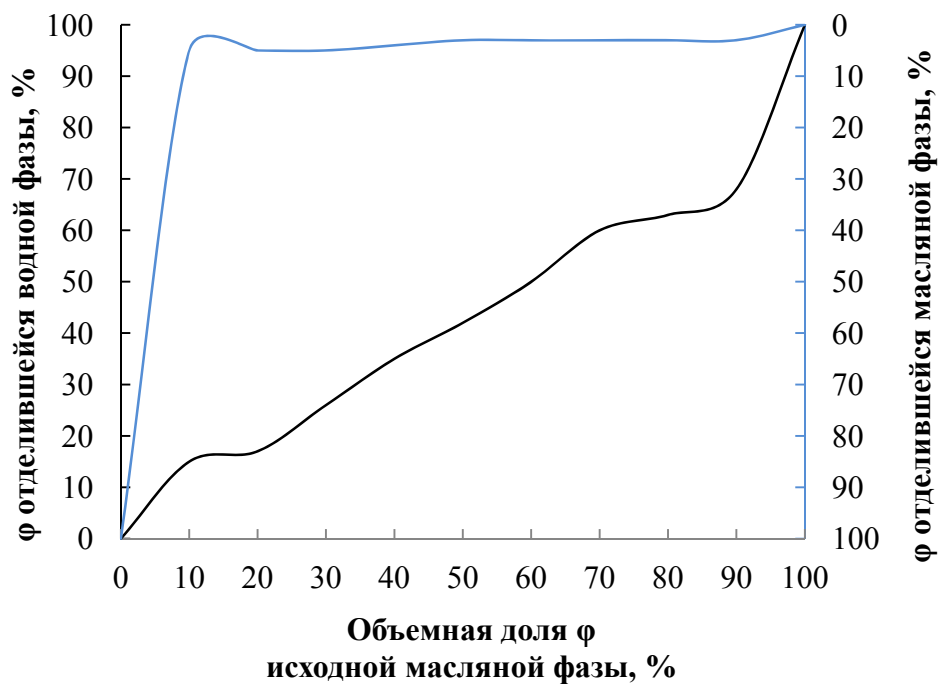


Рис. 5.6. Соотношение объемов фаз в системе «раствор гидролизата - растительное масло» (Использован 10 %-ный раствор гидролизата трески, полученный при многократном внесении ферментного препарата)

В системе «гидролизат - гептан» эмульгирующая способность раствора гидролизата выражена слабее. Стабильная эмульсия имеет максимальную объемную долю 54 % при использовании раствора гидролизата, полученного по модифицированной схеме, при исходной доле жировой фазы 50 % (рис. 5.7). Раствор гидролизата, полученного при однократном внесении ФП, позволяет получить стабильную эмульсию с максимальной объемной долей 14% при исходной доле жировой фазы 30-40 % (рис. 5.8). В системе «гидролизат - гептан» при соотношении раствора гидролизата и гептана 1:1 объемная доля эмульсии на 74 % больше в том случае, если в качестве стабилизатора использовали раствор гидролизата, полученный по модифицированной схеме.

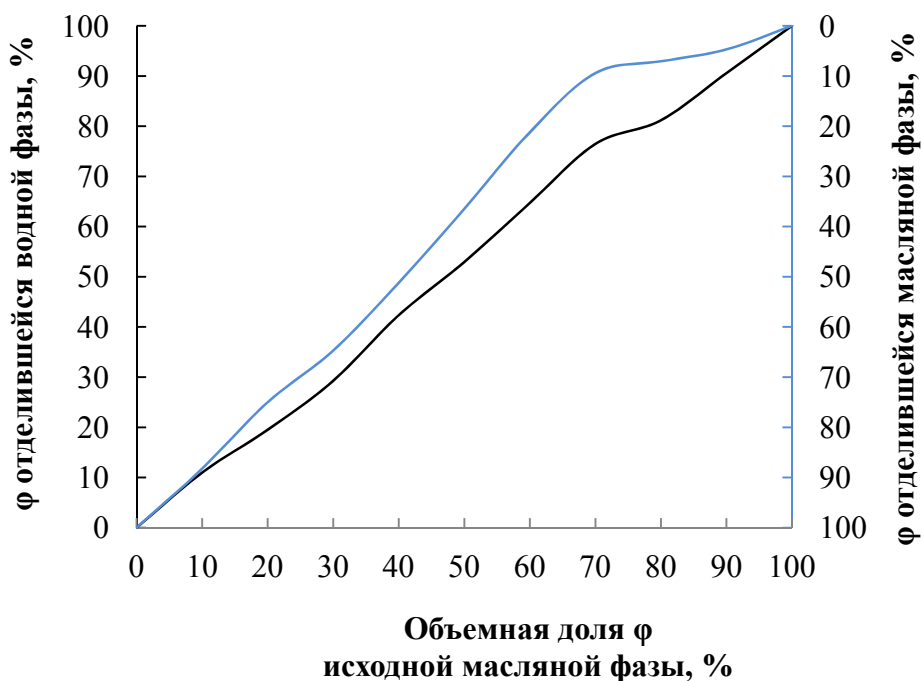


Рис. 5.7. Соотношение объемов фаз в системе «раствор гидролизата - гептан» (Использован 10 %-ный раствор гидролизата трески, полученный при однократном внесении ферментного препарата)

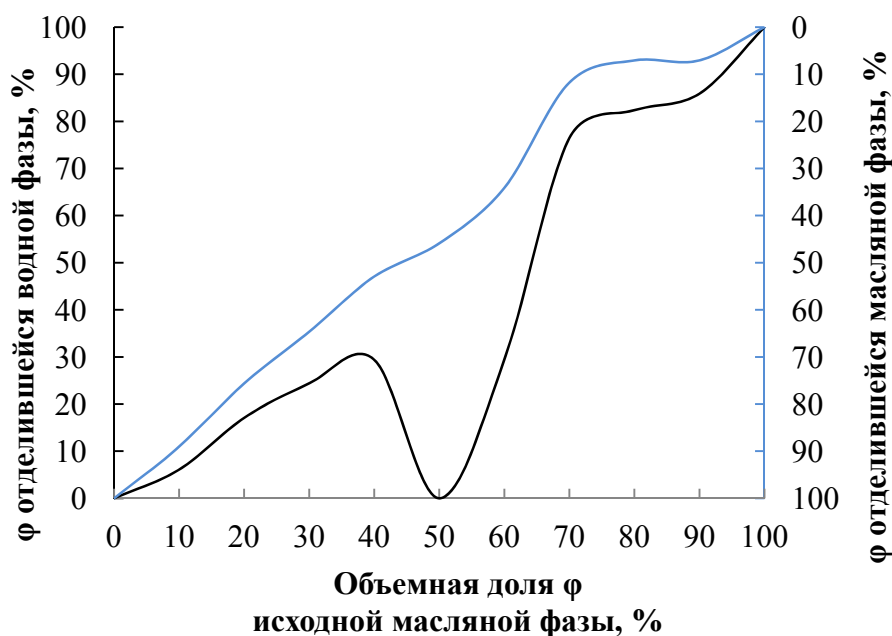


Рис. 5.8. Соотношение объемов фаз в системе «раствор гидролизата - гептан» (Использован 10%-ный раствор гидролизата трески, полученный при многократном внесении ферментного препарата)

По результатам полученных экспериментальных данных установлено, что гидролизаты, полученные модифицированным способом (при многократном внесении ферментного препарата) обладают лучшей эмульгирующей способностью по сравнению с гидролизатами, полученными традиционным способом (при однократном внесении ферментного препарата), а следовательно, в большей степени подходят для использования в качестве компонентов для технических продуктов.

### 5.5. Реологические характеристики эмульсий на основе гидролизатов

На рис. 5.9. представлены кривые течения  $\tau(\dot{\gamma})$  и  $\eta(\dot{\gamma})$  эмульсии растительного масла в воде, стабилизированной белками, входящими в состав рыбного гидролизата, полученного по модифицированной технологии.

Такая эмульсия является устойчивой и способна к течению. При сдвиговой деформации проявляет неньютоновские свойства. Эффективная вязкость снижается при изменении скоростей сдвига  $\dot{\gamma}$  от 0,0413 до 2,15 с<sup>-1</sup>. Напряжение сдвига в этом диапазоне скоростей остается относительно постоянной величиной при скорости сдвига больше 0,5с<sup>-1</sup>.

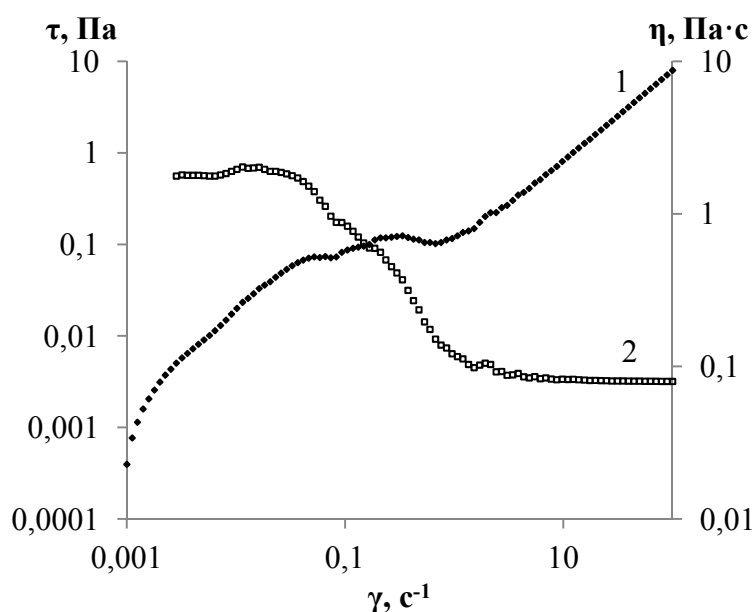


Рис. 5.9. Кривые течения  $\tau(\dot{\gamma})$  (1) и  $\eta(\dot{\gamma})$  (2) эмульсии растительного масла в воде, стабилизированной белками, входящими в состав рыбного гидролизата. Концентрация гидролизата 100 г/л. Гидролизат получен при многократном внесении ФП,  $C_{\text{фп}} = 6\text{г/кг сырь}$ ,  $t = 3$  часа,  $T = 23^\circ\text{C}$

## 5.6. Аминокислотный состав

В работе проведено исследование содержания свободных аминокислот в составе гидролизатов трески, полученных при однократном и многократном внесении ферментного препарата в реакцию смесь (рис. 5.10). Концентрация свободных аминокислот в гидролизатах различается в зависимости от способа внесения ферментного препарата.

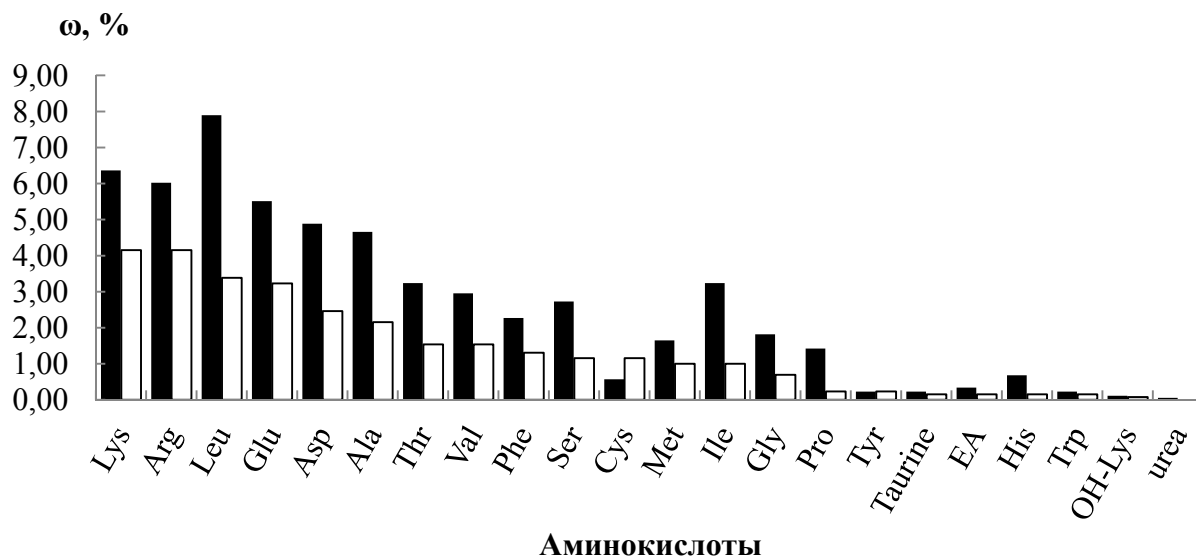


Рис. 5.10. Содержание свободных аминокислот в гидролизатах трески при однократном (светлые колонки) и при многократном (темные колонки) внесении гепатопанкреатина.

Анализ экспериментальных данных показал, что массовая доля целевого продукта, представляющего сумму свободных аминокислот и коротких пептидов, составляет, соответственно, 80,5 и 84,1 %, что превосходит соответствующий показатель аналогичных коммерческих продуктов.

Эти результаты в очередной раз подтверждают высокую специфическую активность гепатопанкреатина к белкам морских гидробионтов. Очевидно, это связано с пищевой специализацией камчатского краба.

Было определено общее содержание свободных аминокислот ( $C_{ам}$ ), характеризующее глубину гидролитического расщепления белков. Для гидролизата, полученного при многократном внесении ферментного препарата,  $C_{ам}$  составляет 57,1 %, что почти в 2 раза превышает аналогичный показатель

для гидролизата, полученного при однократном введении ферментного препарата (30 %).

Концентрация большинства аминокислот в 1,5-2 раза выше в гидролизате, полученном с многократным введением ферментного препарата (рис. 5.10). Необходимо отметить высокое содержание глицина, пролина и оксипролина, источником которых, главным образом, является коллаген. Причина повышенного выхода этих аминокислот в процессе ферментативного гидролиза объясняется наличием большого количества коллагена в сырье и высокой коллагенолитической активностью гепатопанкреатина.

### 5.7. Содержание микроэлементов

В работе проведено исследование содержания микроэлементов в гидролизате, полученном из отходов переработки трески (таблица 5.1).

Таблица 5.1

Содержание микроэлементов в гидролизате тканей трески

Микроэлементы	Ni	Cr	Co	Cu	Mn	Cd	Fe	Zn
C, мкг/г сухого вещества	1,27	1,77	0,53	15,58	0,23	0,14	0,01	0,01

Среднее содержание микроэлементов в исследуемом гидролизате уменьшалось в приведенной последовательности (мкг/г сухого вещества): Cu (15,58) > Cr (1,77) > Ni (1,27) > Co (0,53) > Mn (0,23) > Cd (0,14) > Fe (0,01) > Zn (0,01).

Из рисунка видно, что в растворе рыбного гидролизата преобладают медь, хром и никель.

Концентрация кадмия находится в пределах от 0,01 – 0,09 мкг/г сухого вещества, что не превышает установленного норматива по содержанию тяжелых металлов в рыбных продуктах.

Содержание меди, хрома, марганца, кадмия и никеля в гидролизате выше, чем в исходном сырье, что можно объяснить привнесением их в раствор в составе ферментного препарата.

Результаты сравнения коллоидно-химических свойств растворов рыбных гидролизатов, полученных модифицированным (при многократном внесении ферментного препарата в реакционную смесь) и традиционным (при однократном внесении ферментного препарата) свидетельствуют о том, что предложенная модифицированная технология более эффективна при производстве ферментативных белковых гидролизатов из рыбного сырья.

## **6. Применение ферментативных белковых гидролизатов в качестве основы для микробиологических питательных сред**

Микроорганизмы являются чувствительными индикаторами качества продуктов питания, а также микробиологических питательных сред, поэтому бактериологическому контролю отдается предпочтение в том случае, когда необходимо определить качество того или иного продукта или пригодность питательной среды для культивирования микроорганизмов. В качестве полноценных основ для микробиологических питательных сред часто используют рыбные белковые гидролизаты.

В работе проводили оценку пригодности использования в составе микробиологических питательных сред ферментативных белковых гидролизатов трески, полученных двумя разными способами: традиционным (однократное внесение гепатопанкреатина в реакционную смесь) и модифицированным (многократное внесение гепатопанкреатина). Оценка заключалась в сравнении роста пяти тест-культур (*Staphilococcus aureus* Wood-46, *Escherihia coli* 055 K59 3912/41, *Pseudomonas aeruginosa* 27/99, *Shigella Flexneri* 1a 8516 и *Salmonella Typhi* H-901) на питательных средах, приготовленных на основе ферментативных белковых гидролизатов.

С этой целью ферментативные гидролизаты вводились в состав питательного агара и питательного бульона – универсальных микробиологических сред, которые часто применяются для культивирования и накопления микроорганизмов (ГОСТ 29112-91). В качестве контрольной питательной среды использовали коммерческий питательный бульон (ГРМ-бульон), биологическое качество которого регламентируется ФС 42-3378-97.

### **6.1. Питательный бульон**

Питательный бульон должен обеспечивать во всех засеянных пробирках рост тест-культур при посеве 0,5 мл микробной взвеси для *Escherichia coli* 055 K59 3912/41 и *Pseudomonas aeruginosa* 27/99 - из разведения  $10^{-7}$  через 20-24



часа инкубации, а для *Staphylococcus aureus* Wood – 46 - из разведения  $10^{-6}$  не позднее 48 часов инкубации при температуре  $(37 \pm 1)$  °С в виде диффузного помутнения среды.

Питательный бульон на основе исследуемого гидролизата должен обеспечивать во всех засеянных пробирках образование индола и сероводорода ( $H_2S$ ) тест-культурами *Shigella flexneri* 1a 8516 и *Salmonella typhi* H – 901 соответственно через 20-24 часа инкубации при температуре  $(37 \pm 1)$  °С. Образование индола и сероводорода определяют визуально по изменению цвета полоски индикаторной бумаги (розовое окрашивание индикаторной бумаги на индол и почернение - на сероводород). Для контроля одновременно производили посев микроорганизмов на коммерческий питательный бульон (ГРМ-бульон).

Результаты чувствительности тест-культур на испытываемых средах представлены в таблице 6.1.

При анализе данных из таблицы 6.1 можно сделать вывод о том, что питательный бульон, приготовленный на основе ферментативного гидролизата, полученного при однократном внесении гепатопанкреатина, по чувствительности тест-культур полностью удовлетворяет требованиям ФС 42-3378-97 к их биологическому качеству. Отмечается активный рост *Escherichia coli* 055 K59 3912/41, *Pseudomonas aeruginosa* 27/99 и *Staphylococcus aureus* Wood-46. Культура *Shigella flexneri* 1a 8516 образовывала индол, а *Salmonella typhi* H – 901 сохраняла способность к образованию сероводорода. Питательный бульон, приготовленный на основе гидролизата, полученного при многократном внесении гепатопанкреатина, также соответствует требованиям ФС 42-3378-97 по приведенным выше биологическим показателям. Тест-культура *Staphylococcus aureus* Wood-46 сохраняет чувствительность к росту при разведении  $10^{-6}$ .

Контрольный питательный бульон по биологическим показателям (чувствительности к росту тест-культур и способности образовывать индол и сероводород) соответствует требованиям ФС 42-3378-97.

Таблица 6.1

Характеристика роста и биологические показатели тест-культур на питательном бульоне, приготовленном на основе гидролизатов тканей Атлантической трески

Наименование	Разведение	ТЕСТ - ШТАММ				
		<i>Escherihia coli 055 K59 3912/41</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa 27/99</i>	<i>Staphilococcus aureus Wood-46</i>	<i>Shigella Flexneri Ia 85/16</i>	<i>Salmonella Typhi H-901</i>
Белковый Гидролизат трески, полученный при однократном добавлении гепато-панкреатина	10 <sup>-6</sup>	Рост	Рост	Рост	Индол	H <sub>2</sub> S
	10 <sup>-7</sup>	Рост	Рост	Рост	Индол	H <sub>2</sub> S
	10 <sup>-8</sup>	Рост	Рост	Рост	Индол	H <sub>2</sub> S
Белковый Гидролизат трески, полученный при многократном добавлении гепато-панкреатина	10 <sup>-6</sup>	Рост	Рост	Рост	Индол	H <sub>2</sub> S
	10 <sup>-7</sup>	Рост	Рост	Роста нет	Индол	H <sub>2</sub> S
	10 <sup>-8</sup>	рост	Рост	Роста нет	Индол	H <sub>2</sub> S
Контроль	10 <sup>-6</sup>	Рост	Рост	Рост	Индол	H <sub>2</sub> S
	10 <sup>-7</sup>	Рост	Рост	Рост	Индол	H <sub>2</sub> S
	10 <sup>-8</sup>	Рост	Рост	Рост	Индол	H <sub>2</sub> S

## 6.2. Питательный агар

Эффективность роста тест-культур (их всхожесть) определяли на питательном агаре, который готовили на основе ферментативных белковых

гидролизатов трески, полученных двумя разными способами: традиционным (однократное внесение гепатопанкреатина в реакционную смесь) и модифицированным (многократное внесение гепатопанкреатина).

В качестве контроля использовали коммерческий питательный агар, который применяется для определения количества мезофильных анаэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов. Питательный агар на основе белкового гидролизата должен обеспечивать рост тест-культур сопоставимый с контролем.

Всхожесть тест-культур характеризуется количеством колонии образующих единиц (КОЕ) в пересчете на 1 грамм гидролизата. В качестве тест-культур использовали *Staphilococcus aureus* Wood-46, *Escherihia coli* 055 K59 3912/41 и *Pseudomonas aeruginosa* 27/99.

Результаты посева тест-культур на питательные агары представлены в таблицах 6.2 и 6.3. На основании этих данных, можно сделать вывод о том, что эффективность роста тест-культур на питательном агаре, приготовленном на основе ферментативных гидролизатов трески, полученных традиционным (однократное внесение гепатопанкреатина) и модифицированным (многократное внесение гепатопанкреатина) способом, сопоставима с всхожестью тест-культур на коммерческом питательном агаре.

Был произведен анализ роста каждой тест-культуры на питательном агаре, произведенном на основе экспериментальных ферментативных гидролизатов, полученных традиционным (Гидролизат 1) и модифицированным (Гидролизат 2) способом. В соответствии с требованиями ФС 42-3378-97 анализ роста *Escherihia coli* 055 K59 3912/41 и *Pseudomonas aeruginosa* 27/99 проводился для разведения  $10^{-7}$ ; анализ роста *Staphilococcus aureus* Wood-46 проводился для разведения  $10^{-6}$ .

Эффективность роста тест-культур оценивали, приняв их всхожесть на коммерческом питательном агаре за условную единицу.

Тест-культура *Escherihia coli* 055 K59 3912/41 удовлетворительно растет на питательных агарах, приготовленных на основе экспериментальных

ферментативных гидролизатов. Эффективность роста микроорганизмов на питательном агаре, приготовленном на основе Гидролизата 1 ниже, чем на коммерческом на 6%. Всхожесть тест культуры на питательном агаре на основе Гидролизата 2 на 33% лучше, чем на коммерческом (рис. 6.1).

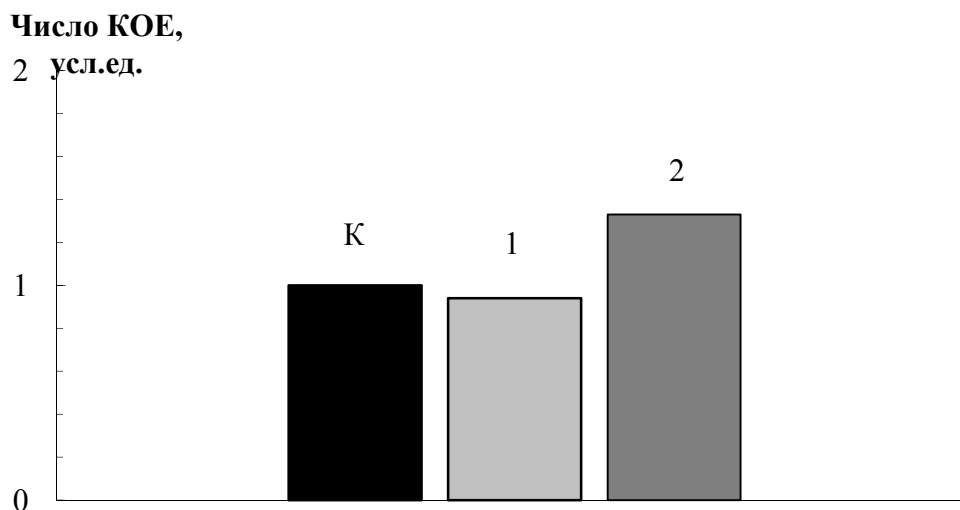


Рис. 6.1. Сравнение эффективности роста тест-культуры *Escherihia coli* 055 K59 3912/41 на коммерческом питательном агаре (К) и на питательных агарах, приготовленных на основе ферментативных белковых гидролизатов трески, полученных при однократном (1) и многократном (2) внесении гепатопанкреатина.

Тест-культура *Pseudomonas aeruginosa* 27/99 удовлетворительно растет на питательных агарах, приготовленных на основе экспериментальных ферментативных гидролизатов. Эффективность роста микроорганизмов на питательном агаре, приготовленном на основе Гидролизата 1 ниже, чем на коммерческом на 12%. Всхожесть тест культуры на питательном агаре на основе Гидролизата 2 на 4% лучше, чем на коммерческом (рис. 6.2).

Всхожесть тест-культуры *Staphilcoccus aureus* Wood-46 на питательном агаре на основе гидролизата 1 на 10% ниже, чем на коммерческом агаре. Количество колоний, выросших на питательном агате на основе гидролизата 2 практически соответствует их количеству, выросшему на коммерческом питательном агаре (рис. 6.3).

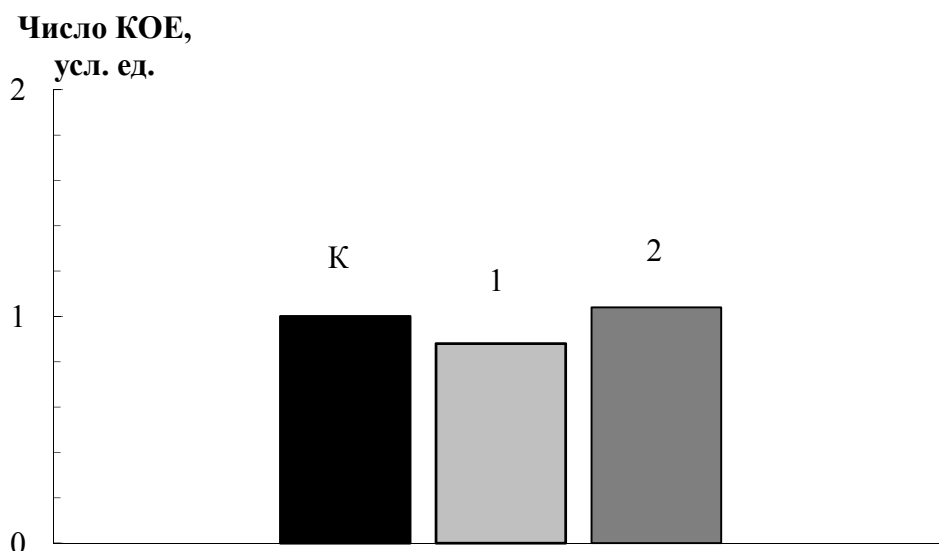


Рис. 6.2. Сравнение эффективности роста тест-культуры *Pseudomonas aeruginosa* 27/99 на коммерческом питательном агаре (К) и на питательных агарах, приготовленных на основе ферментативных белковых гидролизатов трески, полученных при однократном (1) и многократном (2) внесении гепатопанкреатина.

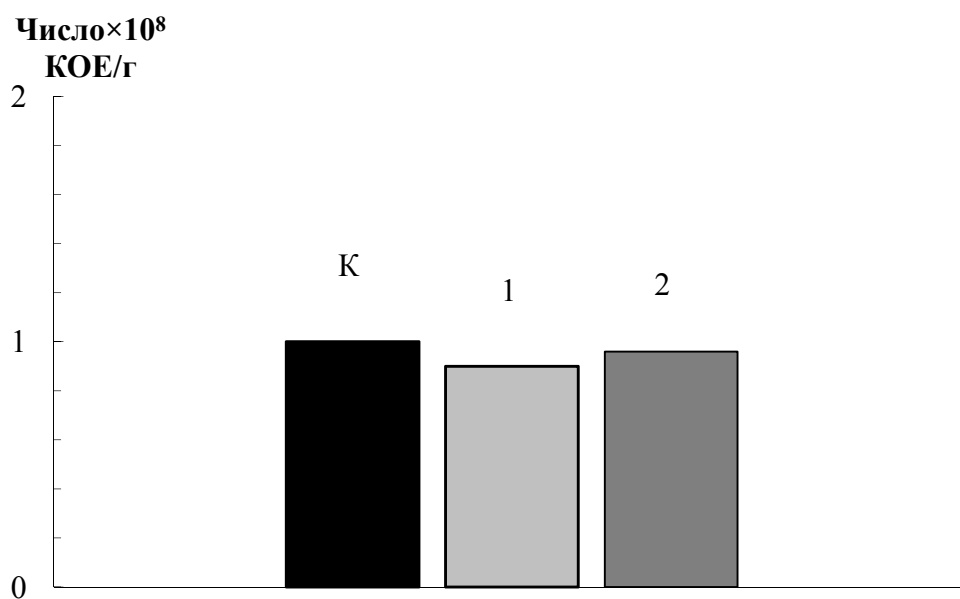


Рис. 6.3. Сравнение эффективности роста тест-культуры *Staphylococcus aureus* Wood-46 на коммерческом питательном агаре (К) и на питательных агарах, приготовленных на основе ферментативных белковых гидролизатов трески, полученных при однократном (1) и многократном (2) внесении гепатопанкреатина.

По результатам проведенных микробиологических исследований установлено, что гидролизаты трески, полученные модифицированным способом при многократном внесении ферментного препарата предпочтительнее использовать в качестве основ для микробиологических питательных сред.

Таблица 6.2

Учет результатов выросших колоний (КОЕ/г) на коммерческом питательном агаре и питательном агаре на основе ферментативного гидролизата трески, полученного при многократном внесении ферментного препарата

Разведение и засеваемый объем	Коммерческий питательный агар			Питательный агар на основе ферментативного гидролизата трески, полученного при многократном внесении гепатопанкреатина		
	<i>Escherihia coli</i> 055 K59 3912/41	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27/99	<i>Staphilcoccus aureus</i> Wood-46	<i>Escherihia coli</i> 055 K59 3912/41	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27/99	<i>Staphilcoccus aureus</i> Wood-46
$10^{-6} / 0,2 \text{ см}^3$	$6,3 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8$	$9,8 \times 10^8$	$1,0 \times 10^9$	$1,2 \times 10^8$	$9,5 \times 10^8$
$10^{-7} / 0,2 \text{ см}^3$	$6,5 \times 10^8$	$4,8 \times 10^8$	$1,0 \times 10^9$	$9,8 \times 10^8$	$5,0 \times 10^8$	$1,0 \times 10^9$
$10^{-8} / 0,2 \text{ см}^3$	$1,0 \times 10^9$	$5,3 \times 10^8$	$1,0 \times 10^9$	$1,0 \times 10^9$	$6,0 \times 10^8$	$1,0 \times 10^9$
Итого:	$7,6 \times 10^8$	$3,8 \times 10^8$	$9,9 \times 10^8$	$9,9 \times 10^8$	$4,1 \times 10^8$	$9,8 \times 10^9$

Таблица 6.3

Учет результатов выросших колоний (КОЕ/г) на коммерческом питательном агаре и питательном агаре на основе ферментативного гидролизата трески, полученного при однократном внесении ферментного препарата

Разведение и засеваемый объем	Коммерческий питательный агар			Питательный агар на основе ферментативного гидролизата трески, полученного при однократном внесении гепатопанкреатина		
	<i>Escherihia coli</i> 055 K59 3912/41	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27/99	<i>Staphilcoccus aureus</i> Wood-46	<i>Escherihia coli</i> 055 K59 3912/41	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27/99	<i>Staphilcoccus aureus</i> Wood-46
10 <sup>-6</sup> / 0,1 мл	8,4×10 <sup>8</sup>	7,7×10 <sup>8</sup>	7,8×10 <sup>8</sup>	7,0×10 <sup>8</sup>	7,4×10 <sup>8</sup>	7,0×10 <sup>8</sup>
10 <sup>-7</sup> / 0,5 мл	8,0×10 <sup>8</sup>	8,0×10 <sup>8</sup>	7,5×10 <sup>8</sup>	7,5×10 <sup>8</sup>	7,0×10 <sup>8</sup>	6,5×10 <sup>8</sup>
10 <sup>-8</sup> / 1,0 мл.	8,8×10 <sup>8</sup>	9,2×10 <sup>8</sup>	7,9×10 <sup>8</sup>	7,1×10 <sup>8</sup>	6,0×10 <sup>8</sup>	7,5×10 <sup>8</sup>
Итого:	8,4×10 <sup>8</sup>	8,3×10 <sup>8</sup>	7,7×10 <sup>8</sup>	7,2×10 <sup>8</sup>	6,8×10 <sup>8</sup>	7,0×10 <sup>8</sup>



## **7. Расчет экономической эффективности получения ферментативного белкового гидролизата из белоксодержащего рыбного сырья**

Расчет ожидаемого экономического эффекта от внедрения процесса ферментативного гидролиза по модифицированной технологии с многократным внесением ферментного препарата в реакционную смесь выполнен в ценах 2014 года с учетом экспериментальных данных, полученных в ходе работы.

Расчет выполнен для тех этапов технологического цикла получения гидролизата, на которых существуют расхождения между модифицированной и традиционной технологией, предполагающей однократное внесение ферментного препарата.

Внедрение новой модифицированной технологии получения гидролизата предполагает увеличение затрат на ферментный препарат, поскольку для производства 1 кг такого гидролизата необходимо внесение большего количества фермента в реакционную смесь.

### **Традиционная технология**

При традиционной технологии производства гидролизата из белоксодержащего рыбного сырья предполагается однократное внесение ферментного препарата в реакционную смесь. Расход ферментного препарата составляет 3-6 г на 1 кг сырья.

Стоимость ферментного препарата по ценам на 2014 год определена в размере 400-2000 рублей за 1 кг.

Экономические показатели традиционной и модифицированной технологии производства ферментативного белкового гидролизата из рыбного сырья приведены в таблице 7.1

Таблица 7.1

Сравнительная характеристика затрат на производство 1 кг ферментативного белкового гидролизата из рыбного сырья

Химический реагент	Технология					
	Традиционная			Модифицированная		
	Цена за кг, руб	Расход, кг/кг сырья	Общий расход, руб	Цена за кг, руб	Расход, кг/кг сырья	Общий расход, руб
Ферментный препарат	2000	0,006	12	2000	0,036	24

Затраты на производство 1 кг гидролизата по традиционной технологии составляют 12 рублей. На производство 1 т гидролизата они составят 12000 рублей.

Цена 1 кг такого гидролизата 4000 рублей, 1 тонны – 4000000 рублей.

Рассчитаем прибыль от производства гидролизата по формуле

$$П = Д - С, \quad (1)$$

где П – прибыль от производства гидролизата, руб.;

Д – доход, руб.;

С – капиталовложения, руб.

$$П = 4000000 - 12000 = 3988000 \text{ руб.}$$

Налог на прибыль составляет 20%, значит, прибыль после налогообложения (ЧП) составляет 3190400 рублей.

Рассчитаем окупаемость производства гидролизата по формуле

$$Т = С/П, \quad (2)$$

где Т – окупаемость, г.

$$Т = 12000/3190400 = 0,0037 \text{ г.}$$

Окупаемость производства 1 т гидролизата, полученного по традиционной технологии, составляет 1,35 дня.

### **Модифицированная технология**

Затраты на производство 1 кг гидролизата по модифицированной технологии составляют 24 рубля. На производство 1 т гидролизата они составят 24000 рублей.

Цена 1 кг такого гидролизата 4100 рублей, 1 тонны – 4100000 рублей.

Прибыль от производства гидролизата по формуле 1:

$$\Pi = 4100000 - 24000 = 4076000 \text{ руб.}$$

Налог на прибыль составляет 20%, значит, прибыль после налогообложения (ЧП) составляет 3260800 рублей.

Окупаемость производства гидролизата по формуле 2:

$$T = 24000/3260800=0,0074 \text{ г.}$$

Окупаемость производства 1 т гидролизата, полученного по традиционной технологии, составляет 2,7 дня.

## **Выводы**

1. Предложен способ совершенствования технологии ферментативных рыбных гидролизатов путем использования многократного введения ферментного препарата гепатопанкреатина в реакционную систему.

2. Рассчитаны константы скорости реакции гидролиза белоксодержащего рыбного сырья. Показано, что при многократном введении фермента скорость реакции значительно превышает аналогичный параметр при проведении процесса при однократном введении фермента. Степень гидролиза увеличивается и достигает 65-70%.

3. Предложена кинетическая модель, описывающая механизм протеолиза. Механизм предполагает наличие в составе субстрата двух групп белков – легко гидролизуемых и трудно гидролизуемых под действием фермента гепатопанкреатина, а также учитывает расход фермента вследствие его автолиза.

4. Показано изменение коллоидно-химических свойств гидролизатов, полученных при многократном введении фермента по сравнению с гидролизатами, полученными при традиционном способе однократного введения фермента в реакционную смесь. Обнаружено увеличение количества свободных аминокислот примерно в 2 раза, увеличение содержания низкомолекулярных белковых фракций, а также возрастание дисперсности водных растворов (золей) гидролизатов.

5. Методами ротационной вискозиметрии установлено уменьшение на два порядка вязкости реакционной смеси в первые 30 минут протекания реакции протеолиза, что указывает на резкое снижение содержания высокомолекулярных белковых фракций на начальной стадии гидролиза.

6. Показано, что белковые гидролизаты, полученные по усовершенствованной технологии, снижают поверхностное натяжение до более низких значений и обладают повышенной эмульгирующей способностью по сравнению с гидролизатами, произведенными по традиционной технологии.

7. Проведены лабораторные и опытно-промышленные испытания предложенного способа получения ферментативного белкового гидролизата из

отходов переработки тресковых видов рыб. Изготовлены экспериментальные партии белкового гидролизата, полностью отвечающего требованиям действующей нормативной документации. Показана его пригодность для использования в качестве основы микробиологических питательных сред.

8. Разработана технологическая инструкция получения ферментативного белкового гидролизата из отходов рыбопереработки. Оценена экономическая эффективность предложенной технологии.

## **Литература**

1. Аламдари, Х. Определение оптимальных режимов получения белковых гидролизированных компонентов из кильки для стартовых кормов осетровых рыб / Х. Аламдари, Н. В. Долганова, С. В. Пономарев // Вестник АГТУ. Сер.: Рыбное хозяйство. - 2013. - № 1. - С. 173-179.
2. Алексеенко, Л. П. Определение активности протеиназ по расщеплению белковых субстратов / Л. П. Алексеенко // Современные методы в биохимии. Т. 2. - М.: Медицина, 1968. - 112 с.
3. Антипова, Л. В. Исследование свойств полученного желатина из чешуи и пузыря прудовых рыб / Л. В. Антипова, До Ле Хыу Нам // мат. межд. науч.-практ. конф. «Глобальная научная интеграция» // Тамбов. – 2011. - С. 98-99.
4. Антипова, Л. В. Основы рационального использования вторичного коллагенсодержащего сырья мясной промышленности / Л. В. Антипова, И. А. Глотова // Биотехнология. – 1999. - № 5. – С. 47-54.
5. Антонов, В. К. Специфичность и механизм действия протеолитических ферментов / В.К. Антонов // Биоорганич. химия. - 1980. - Т. 6, № 6. - С. 805-839.
6. Артемьева, Н. Н. Термические характеристики рыбных белковых гидролизатов как объектов сушки / Н. Н. Артемьева // Вестник АГТУ. Механика. – 1998. – С. 25-28.
7. Артюхин, В. И. Белковые гидролизаты в производстве питательных сред / В. И. Артюхин, А. П. Шепелин, Н. В. Киселева. // Производство и применение продуктов микробиологических производств : М., 1990. - вып. 9–10. – 52 с.
8. Асатиани, В. С. Ферментативные методы анализа / В. С. Асатиани. - М. : Наука, 1969. – 740 с.
9. Бабаян, Т. Л. Способ оценки протеиназной активности комплексного ферментного препарата по данным кинетики протеолиза модельного белкового субстрата / Т. Л. Бабаян В. К. Латов // Биотехнология. – 2003. - № 6. – С. 47-51.
10. Бактериологические среды для санитарной и клинической микробиологии, биотехнологии и контроля лекарственных сред : каталог / М-во здравоохранения РФ, Гос. науч. центр прикладной микробиологии, отд-ние

«Питательные среды». - Изд. 4-е, испр. – пос. Оболенск (Моск. обл.) : [б. и.], 1999. – 57 с.

11. Беликов, В.М. Кинетика казеина протеолитическими ферментами / В. М. Беликов Т. В. Антонова, Б. А. Квасов // Биоорганическая химия. - 1979. - Т. 5, № 3. - С. 449-457.

12. Березин, И. В. Основы физической химии ферментативного катализа / И. В. Березин, К. Мартинек. - М. : Высш. шк., 1977. – 280 с.

13. Березов, Т. Т. Применение ферментов в медицине / Т. Т. Березов // Соросовский образовательный журнал. – 1996. - № 3. - С. 23-27.

14. Бессмертная, И. А. Обогащение хлебобулочных изделий белково-минеральной пищевой добавкой из рыбного сырья / И. А. Бессмертная, Н. Н. Законова, М. А. Левоник // мат. науч. конф. «Инновации в науке и образовании – 2005». – КГТУ, Калининград, 2005. – С. 257–258.

15. Блинова, А.Ю. Производство лекарств и косметических препаратов / Рыб. Хоз-во. Сер. Обработка рыбы и морепродуктов: информ пакет / ВНИЭРХ. – 1999. – Вып. 4(1) – С.1-13.

16. Богданов, В. Д. Структурообразователи и рыбные композиции / В. Д. Богданов, Т. М. Сафронова. – М. : ВНИРО, 1993. – 172 с.

17. Болдырев, А. А. Регуляция активности мембранных ферментов / А. А. Болдырев // Соросовский образовательный журнал. – 1997. - № 6. - С. 21-27.

18. Боровик, Т. Э. Диетотерапия при пищевой аллергии у детей раннего возраста / Т. Э. Боровик, В. А. Ревякина, С. Г. Макарова // Российский Аллергологический Журнал. Приложение к № 4. – 2004. – 20 с.

19. Бульон с профилактическими свойствами, содержащий белковый гидролизат и способ получения этого гидролизата : заявка на изобретение 2007141314/13 А, МПК, А 23 J 1/02, В.Г. Волик [и др.] ; Общество с ограниченной ответственностью «Символ-БИО». – заявл. 09.11.2007; опубл. 20.05.2009.

20. Варфоломеев, С. Д. Химическая энзимология / С. Д. Варфоломеев. - М. : Academia, 2005. – 480 с.
21. Виннов, А.С. Кинетический анализ процесса ферментативного гидролиза белков мышечной ткани рыбы / А. С. Виннов, Н. В. Долганова // Вестник АГТУ. Сер.: Рыбное Хозяйство. 2013. - №3. - С. 153-161.
22. Воронина, Т. Ю. Получение гидролизатов из дефектного зерна злаков / Т. Ю. Воронина, Т. В. Рязанова, С. М. Воронин // Химия растительного сырья. - 1998. - № 2. - С. 15-16.
23. Выделение серил-т РНК синтетазы из печени животных экспресс-методом / О. И. Гудзера [и др.] // Биополимеры и клетка. - 1990. - № 2. - С. 105-107.
24. Гидролиз пшеничной муки под действием препаратов амилазы и индивидуальных ферментов / И. Н. Зоров, М. В. Семёнова, Н. В. Цурикова, А. П. Синицын // Прикладная биохимия и микробиология. – 2006. – Т. 42, № 6. – С. 700-704.
25. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение : пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак. — М. : Мир, 2002. — 589 с.
26. Гранатова, В. П. Теория и практика получения и применения натуральных структурообразователей / В. П. Гранатова, А. А. Запорожский, Г. И. Касьянов // Изв. вузов. Пищевая технология. – 2007. - №2.- С. 5-8.
27. Грибакин, С. Г. Принципы использования молочных и специальных смесей в практике педиатра / С. Г. Грибакин, А. В. Андреева, Т. И. Гаранкина // Вопросы современной педиатрии. – 2007. – Т. 6, № 1. – С. 62-68.
28. Грицаенко, Н. С. Научное обоснование технологии производства слабосоленой сельди предварительного созревания / Н. С. Грицаенко, // Вестник КамчатГТУ. - 2003. - № 2. - С. 24-27.
29. Гурова, Н. В. Методы определения эмульсионных свойств белков / Н. В. Гурова, А. Н. Гуров, Э. С. Токаев. – М. : АгроНИИТЭИмясомолпром, 1994. – 32 с.



30. Двинин, Ю. Ф. Технохимический состав органов и тканей трески / Ю. Ф. Двинин, Л. Л. Константинова, В. И. Кузьмина // Атлантическая треска: биология, экология, промысел / Ю. Ф. Двинин, Л. Л. Константинова, В. И. Кузьмина. – СПб. : Наука, 1996. – Гл. 1, разд. 1.7. – С. 66-74.
31. Диксон, М. Ферменты : пер. с англ. / М. Диксон, Э. Уэбб. – М. : Мир, 1982. – Т. 1. – 515 с.
32. Дифференциально-диагностическая среда для выделения листерий : описание изобретения к патенту, 2223313/13, С2, МПК<sup>7</sup>, С 12 N 1/20, С 12 Q 1/04, Храмов М.В. [и др.] ; Государственный научный центр прикладной микробиологии, Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности РАСХН, заявл. 26.12.2001, опубл. 10.02.2004
33. Журавская, Н. К. Перспективы использования ферментного препарата, полученного из внутренностей гидробионтов, для повышения качественных показателей мясопродуктов / Н. К. Журавская, Т. Д. Ноздрина : мат. науч.-тех. конф. «Прикладная биотехнология на пороге XXI века». – М., 1995. – с. 54.
34. Закономерности гидролиза сывороточных белков экзо- и эндопротеазами / Т. Н. Головач, Н. В. Гавриленко, Н. К. Жабанос, В. П. Курченко // Труды БГУ. – 2008. – Т. 3, ч. 1. - 15 с.
35. Злобин, А. А. Общая химическая характеристика водорастворимых полисахаридов плодов шиповника морщинистого *Rosa Rugosa* / А. А. Злобин, Р. Г. Оводова, С. В. Попов // Химия растительного сырья. - 2003. - № 2. - С. 39–44.
36. Зырин, Н. Г. Спектральный анализ почв, растений и других биологических объектов. / Н. Г. Зырин, А. И. Обухов. - М. : Изд-во Моск. ун-та, 1977. – 334 с.
37. Изучение условий гидролиза желатина с целью разработки защитных сред для лиофилизации биопрепаратов / Н. А. Вараксин [и др.] // Биотехнология. – 2000. - № 2. - С. 14-23.

38. Использование рыбной чешуи в технологии пищевых и кормовых продуктов / О. Я. Мезенова, Л. С. Байдалинова, В. И. Воробьев, Н. Ю. Мезенова, А. А. Лазукова // Известия КГТУ. – 2015. - №37. – С. 92-101.

39. Капранчиков, В. С. Препаративное получение и характеристика липазы зародышей пшеницы / В. С. Капранчиков, А. Н. Жеребцов, Т. Н. Попова // Прикладная биохимия и микробиология. – 2004. – Т. 40, № 1. - С. 98-103.

40. Карташева, Л. Д. Разработка и производство препаратов медицинской биотехнологии. В 2 ч. Ч. 2. / Л. Д. Карташева, М. И. Богданова, Н. В. Пепетин. – Махачкала : Изд-во, 1990. – С. 282-283.

41. Касьянов, Г. И. Нанобиотехнология переработки рыбного сырья / Г. И. Касьянов, О. В. Сарапкина, С. В. Белоусова. - Краснодар: КрасНИИРХ, 2006. – 150 с.

42. Кинетические характеристики ферментативного гидролиза сложных белковых субстратов для получения питательных сред / А. Д. Неклюдов, А. В. Бертудина, А. Н. Иванкин, Б. С. Карпо // Прикладная биохимия. – 2002. – Т. 38, № 4. – С. 381-388.

43. Костюрина, К. В. Изучение ферментативной кинетики протеинсодержащего сырья как основополагающего биотехнологического процесса при получении новых продуктов / К. В. Костюрина, М. Е. Цибизова // Вестник АГТУ. - 2007. - № 3 (38). - С. 125-129.

44. Кучина, Ю.А. Химический и аминокислотный анализ белковых гидролизатов из гидролизатов, полученных по ферментативной электрохимической технологии / Ю. А. Кучина, С. Ю. Дубровин, И. Н. Коновалова // V Междунар. науч. конф «Инновации в науке и образовании – 2007», 23-25 октября : труды науч. конф. : в 2 ч. / КГТУ. – Калининград, 2007. – Ч. 1. – С. 354-357.

45. Лагунов, Л. Л. Технология продуктов из беспозвоночных / Л. Л. Лагунов, Н. И. Рехина – М. : Пищевая пром-ть, 1965. – 519 с.

46. Лаженцева, Л. Ю. Разработка технологии нового эмульсионного продукта на основе гидролизата из кальмара / Л. Ю. Лаженцева, О. В. Зимина // Научные труды Дальрыбвтуза. – 2012. – Т. 25. - С. 95–101.

47. Лаптева, А. М. Тяжелые металлы и микроэлементы в промысловых рыбах Баренцева моря / А. М. Лаптева // мат. междунар. науч.-техн. конф. «Актуальные проблемы освоения биологических ресурсов Мирового океана». – Владивосток : Дальрыбвтуз, 2010. – С. 145-148.

48. Левченко, С. А. Исследование молекулярных свойств желатина / С. А. Левченко, В. В. Садовой // мат. XIII науч.-техн. конф. «Вузовская наука – Северо-Кавказскому региону». – Т. 1. – Ставрополь : СевКавГТУ, 2009. - 217 с.

49. Максимова, Е. М. Разработка технологии утилизации белковых отходов методом ферментативного гидролиза / Е. М. Максимова // Вестник МГТУ. – Мурманск, 2006. – Т. 9, № 5. – С. 875-879.

50. Максимюк, Н. Н. О преимуществах ферментативного способа получения белковых гидролизатов / Н. Н. Максимюк, Ю. В. Марьяновская // Фундаментальные исследования. - 2009. - № 1. – С. 34-35.

51. Мезенова, О. Я. Гидролизаты рыбной чешуи в составе биологически активных добавок для спортсменов / О. Я. Мезенова, Н. Ю. Мезенова, Л.С. Байдалинова // Известия ТИНРО. – 2014. – Т. 177. – С. 287-294

52. Мезенова О.Я. Основные принципы переработки вторичного рыбного сырья на пищевые биопродукты / О. Я. Мезенова, Е. С. Землякова // Известия КГТУ. – 2014. - №35. – С. 120-130

53. Мелентьев, А. И. Выделение, очистка и характеристика хитиназы Bacillus SP/739 / А. И. Мелентьев, Г. Э. Актуганов // Прикладная биохимия и микробиология. – 1999. – Т. 35, № 6. – С. 624-628.

54. Методы исследования структуры и свойств полимеров учеб. пособие / И. Ю. Аверко-Антонович, Р. Т. Бикмуллин. – Казань, КГТУ. – 2002. - 604 с.

55. Мирзаева, О.А. Получение и применение кератинсодержащего гидролизата пера птицы в производстве продукции пищевой, медицинской,

косметической промышленности / О. А. Мирзаева, С. В. Полянских // Современные наукоемкие технологии. – 2010. - № 3. – С. 23-24.

56. Мосин, О. В. Разработка методов биотехнологического получения белков, аминокислот и нуклеозидов, меченных  $^2\text{H}$  (D) И  $^{13}\text{C}$ , с высокими степенями изотопного обогащения : автореф. дисс. ... канд. хим. наук : 03.00.23 / Мосин Олег Викторович. – М., 1996. – 37 с.

57. Мухин, В. А. Выделение, очистка и характеристика комплекса протеиназ из гепатопанкреаса камчатского краба *Paralithodes camtschatica* / В. А. Мухин, В. Ю. Новиков : тез. докл. 10-ой научн.-техн. конф. профессорско-преподавательского состава МГТУ. – Мурманск : МГТУ, 1999. - С. 354-355.

58. Мухин, В. А. Оценка степени автолиза белка в гепатопанкреасе камчатского краба *Paralithodes camtschatica* методом гель-фильтрации / В. А. Мухин, И. Н. Мухина, Т. К. Лебская // Химия и технология обработки гидробионтов. - Владивосток : Изв. ТИНРО. - 1999. - Т. 125. - С. 249-253.

59. Мухин, В. А. Протеолиз и протеолитические ферменты в тканях морских беспозвоночных / В. А. Мухин, В. Ю. Новиков. – Мурманск : ПИНРО, 2002. – 117 с.

60. Мухин, В. А. Ферментативные белковые гидролизаты тканей морских гидробионтов: получение, свойства и практическое использование / В. А. Мухин, В. Ю. Новиков. – Мурманск : Изд-во ПИНРО, 2001. – 101 с.

61. Неклюдов, А. Д. Гидролиз пептидов иммобилизованными бактериальными пептид-гидролазами / А. Д. Неклюдов, Е. К. Денякина // Прикладная биохимия и микробиология. – 2004. – Т. 40, № 4. – С. 435-441.

62. Неклюдов, А. Д. Получение и очистка белковых гидролизатов (обзор) / А. Д. Неклюдов, А. Н. Иванкин, А. В. Бердугина // Прикладная биохимия и микробиология. – 2000. – Т. 36, № 4. – С. 371-379.

63. Неклюдов, А. Д. Свойства и применение белковых гидролизатов (обзор) / А. Д. Неклюдов, А. Н. Иванкин, А. В. Бердугина // Прикладная биохимия и микробиология. - 2000. - Т. 35, № 5. - С. 525-534.

64. Неклюдов, А.Д., Получение белковых гидролизатов с заданными свойствами / А. Д. Неклюдов, С. М. Навашин // Прикладная биохимия и микробиология. – 1985. – Т. 21, № 3. – С. 3-17.

65. Овчинникова, С. И. Эколого-биохимические исследования гидробионтов - важное направление для решения проблемы сохранения биоразнообразия экосистем Кольского Севера / С. И. Овчинникова // Вестник МГТУ. - Мурманск, 2006. - Т. 9, № 5. - С. 809-815.

66. Остерман, Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование / Л. А. Остерман. - М. : Наука, 1981. – 286 с.

67. Паулов, Ю.В. Белковый состав и реологические характеристики мышечных тканей крабов-стригунов / Ю.В. Паулов // мат. всеросс. конф. молодых ученых «Комплексные исследования и переработка морских и пресноводных гидробионтов». – Владивосток : Тинро-центр, 2003. – С. 158-160.

68. Пащенко, В. Л. Разработка технологии функционального продукта с применением коллагенового гидролизата / В. Л. Пащенко, С. А. Сторублевцев // Фундаментальные исследования. – 2011. - № 4. - С. 127–135.

69. Питательная среда для выделения сальмонелл и шигелл : описание изобретения к патенту 2079254/13, С1, МПК<sup>6</sup>, С 12 Q 1/04, С 12 R 1:42, А. П. Шепелин [и др.] ; Государственный научно-исследовательский институт прикладной микробиологии, заявл. 02.12.1993, опубл. 10.05.1997

70. Питательная среда для выращивания микроорганизмов : описание изобретения к патенту, 2089609/13, С1, МПК<sup>6</sup>, С 12 N 1/20, А. П. Шепелин [и др.] ; Государственный научно-исследовательский институт прикладной микробиологии, заявл. 02.12.1993, опубл. 10.09.1997

71. Пищевой общеукрепляющий профилактический продукт из хрящевой ткани гидробионтов и способ его получения : описание изобретения к патенту 2250047/13, С1, МПК<sup>7</sup>, А 23 L 1/30, А 23 L 1/325, Т.Н. Пивненко [и др.] ; Федеральное государственное унитарное предприятие Тихоокеанский научно-

исследовательский рыбохозяйственный центр. Заявл. 18.11.2003, опубл. 20.04.2005.

72. Поверин, А. Д. Протеолитические ферменты в производстве белкового препарата «СФАГ-2» / А. Д. Поверин // Рыбная промышленность. – 2006. - № 1 – С. 23-24.

73. Подгурская, О.В. Аккумуляция и распределение тяжелых металлов в органах мидии Грея *Crenomytilus grayanus* из районов апвеллинга Японского и Охотского морей / О.В. Подгурская, В. Я. Кавун, О. Н. Лукьянова // Биология моря. - 2004. - Т. 30, № 3. - С. 219-226.

74. Получение аминокислотных смесей из дрожжевых автолизатов, III исследование процесса очистки дрожжевого автолизата на разных сорбентах / А. Д. Неклюдов, В. В. Цибанов, Х. А. Купов, В. М. Беликов // Хим.-фармацевт. Журн. – 1983. - №11. – с. 1348–1352.

75. Получение и применение белковых гидролизатов / В. И. Ивашов, А. Д. Неклюдов, Н. В. Федорова, Р. А. Хромова. - М. : НИИТЭИММП, 1991. – 44 с.

76. Попова, Т. С. Парентальное и энтаральное питание в хирургии / Т. С. Попова, Т. Ш. Тамазашвили, А. Е. Шестопапов. – М. : М-СИТИ, 1996. – 224 с.

77. СанПиН 2.3.2.1078-01 «Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов» М.: МЗ России, 2002.

78. СанПиН 42-123-4089-86. «Предельно допустимые концентрации тяжелых металлов и мышьяка в продовольственном сырье и пищевых продуктах» М. : МЗ СССР, 1986.

79. Севодина К.В. Кинетическое моделирование и его роль в изучении процессов неферментативного потемнения пищевых продуктов / К.В. Севодина, Г.И. Севодина // Ползуновский вестник. – 2011. - №4-1. – с. 56-58.

80. Скоупс, Р. Методы очистки белков : пер. с англ. / В. К. Антонова. – М. : Мир, 1985. – 358 с.

81. Смородин, А. В. Автолиз и функционально-технологические характеристики мышечной ткани в зависимости от температуры / А. В. Смородин, Е. П. Мирошникова, Г. Б. Родионова // Вестник ОГУ. - 2009. - № 4. - С. 112-116.

82. Соколов, А. А. Физико-химические и биохимические основы технологии мясопродуктов / А. А. Соколов. – М.: Пищевая промышленность, 1965. – 492 с.

83. Способ подготовки коллагенсодержащего сырья для производства колбасной оболочки : а. с. 680713 СССР, МКИ 2 А 23 J 1/10, А 22 С 13/ 00 / А. П. Комлев и др.. № 2490839/13 ; заявл. 20.05.77 ; опубл. 25.08.79, Бюл. № 31.

84. Способ получения бактериального препарата Родер для очистки почв, почвогрунтов, нефтешламов, пресных и минерализованных вод от нефти и нефтепродуктов : описание изобретения к патенту, 2295403/13, С1, МПК, В 09 С 1/10, С 02 F 3/34, С 12 N 1/20, В.П. Мурыгина [и др.], заявл. 13.09.2005, опубл. 20.03.2007

85. Способ получения белково-нуклеинового гидролизата : описание изобретения к патенту 2055482/13, С1, МПК<sup>6</sup>, А 23 J 3/04, А 23 J 3/00, А 23 J 3/34, А 61 К 35/60, Ю.М. Гафуров [и др.] ; Тихоокеанский институт биоорганической химии Дальневосточного отделения РАН, заявл. 13.05.1994, опубл. 10.03.1996.

86. Способ получения ихтиожелатина : заявка на изобретение МПК С 09 Н 1/00 / Долганова Н. В., Якубова О. С.; заявитель и патентообладатель Долганова Н. В. - № 2004125134/13 ; заявл. 10.02.2006; опубл. 27.01.2007.

87. Способ получения ферментативных белковых гидролизатов из гидробионтов для микробиологических и/или кормовых целей. Мухин В. А., Новиков В. Ю., Макин А. А.; Полярный НИИ морского рыбного хозяйства и океанографии им. Н. М. Книповича (ПИНРО) : Пат. 2215425 RU, МКП<sup>7</sup> А 23 J 1/4, 3/30, 3/34. – Заявл. 04.06.2001; № 2001115122/13; Опубл. 10.11.2003, Бюл. № 31.- 7 с.

88. Способ приготовления корма для ранней молоди лососевых рыб : пат 2366265 МПК А23Л1/00 Мухина И.Н., Мухин В.А., Новиков В.Ю. ;

Патентообладатель ФГУП Полярный научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии им. Н.М. Книповича. - № 2007147493/13 ; заявл. 19.12.2007; опубл. 10.09.2009

89. Способ приготовления питательной среды для выявления кишечной палочки серотипа 0157 : заявка на изобретение 2004105096/13, А, МПК<sup>7</sup> С 12 N 1/20, С 12 Q 1/04, В.И. Терехов [и др.] ; Кубанский государственный аграрный университет, заявл 20.02.2004, опубл. 27.07.2005

90. Степанова, Е. В. Сравнение эффективности использования ферментных препаратов полигалактуроназного и  $\beta$ -глюкозидазного действия для стабилизации плодового виноматериала из алычи / Е. В. Степанова [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. - 2006. - № 6. - С. 692-699.

91. Страйер, Л. Биохимия. В 3-х т. Т. 1. : пер. с англ. / Л. Страйер. – М. : Мир, 1984. - 232 с.

92. Телишевская, Л.Я. Белковые гидролизаты: получение, состав, применение / Л. Я. Телишевская. – М.: Аграр. Наука, 2000. – 295 с.

93. Технология рыбы и рыбных продуктов: учебник для вузов / В. В. Баранов, И. Э. Бражная, В. А. Гроховский [и др.] ; Под ред. А. М. Ершова. – СПб. : ГИОРД, 2006. – 344 с.

94. Токаев, Э. С. Современный опыт и перспективы использования препаратов сывороточных белков в производстве функциональных напитков./ Э. С. Токаев, Е. Н. Баженова, Р. Ю.Мироедов // Молочная промышленность. - 2007. - № 10. – С. 55-56.

95. Устинова, А. В. Мясные продукты для детского питания / А. В. Устинова, Н. В. Тимошенко. - М. : Изд-во ВНИИ мясной промышленности, 1997. – 252 с.

96. Файнвишевский, М. Л. Производство животных кормов / М. Л. Файнвишевский, С. Г. Либерман. – М. : Лег и пищ. Пром-сть, 1984. – 327 с.



97. Ферментативный гидролиз  $\alpha$ -хитина / А. В. Ильина, О. Ю. Зуева, А. С. Лопатин, В. П. Варламов // Прикладная биохимия и микробиология. – 2004. – Т. 40, № 1. - С. 42-45.
98. Филлипович, Ю. Б. Основы биохимии / Ю. Б. Филлипович. – 4-е изд., перераб. и доп. – М. : Агар, 1999. – 519 с.
99. Хайруллин, М.Ф. Использование стартовых культур при формировании качества мясопродуктов / М. Ф. Хайруллин, М. Б. Ребезов : мат. межрегион. научн.-практ. конф. «Проблемы развития АПК Саяно-Алтая». – Абакан : КрГАУ, 2009. – С.74–76.
100. Характеристика протеолитических комплексов, выделенных из гепатопанкреаса крабов / В. А. Мухин, В. Ю. Новиков, Н. М. Куприна, Н. А. Герасимова // Прикладная биохимия и микробиология. – 1999. – Т. 35, № 3. - С. 303–307.
101. Химический состав и биохимические свойства гидробионтов прибрежной зоны Баренцева и белого морей / Т. К. Лебская [и др.]. – Мурманск : Изд-во ПИНРО, 1998. – 150 с.
102. Цибизова, М. Е. Изучение технологических свойств рыбных автолизатов, полученных из маломерного сырья Волго-Каспийского бассейна / М. Е. Цибизова, К. В. Костюрина // Вестник АГТУ. Серия: Рыбное хозяйство. - 2010. - №1. - С. 176-181.
103. Цибизова, М. Е. Исследование возможности биотрансформации рыбного сырья как основного компонента биопродуктов / М. Е. Цибизова, Н. Д. Аверьянова, Д. С. Язенкова // Вестник АГТУ. : Рыбное хозяйство. - 2009. - № 1. - С. 170-175.
104. Цибизова, М. Е. Ферментация костной ткани рыбного сырья как один из этапов получения структурообразователей / М. Е. Цибизова, Д. С. Язенкова, А. Ю. Акимова // Вестник АГТУ. Сер.: Рыбное хозяйство. - 2010. - № 2. - С. 144-149.

105. Черногорцев, А. П. Технология получения новых белковых продуктов : учеб. пособие для вузов. / А. П. Черногорцев, Р. Г. Разумовская. – Мурманск, 1999. – 76 с.
106. Шмид, Р. Неформальная кинетика. В поисках путей химических реакций / Р. Шмид, В. Н. Сапунов : пер. с англ. - М. : Мир, 1985. - 264 с.
107. Шульц, Г. Принципы структурной организации белков / Г. Шульц, Р. Ширмер ; пер. с англ. – М.: Мир, 1982. – 361 с.
108. Эмульсии / под ред. Ф. Шермана ; пер. с англ. под ред. А. А. Абрамзона – Л.: Химия, 1972. – 448 с.
109. Язенкова Д. С. Некоторые аспекты получения белковой массы из маломерного рыбного сырья Волго-Каспийского бассейна / Д. С. Язенкова, Н. Д. Аверьянова, М. Е. Цибизова // Вестник АГТУ. Сер. : Рыбное хозяйство. - 2011. - № 2. - С. 186-192.
110. Якубке, Х. Д. Аминокислоты, пептиды, белки / Х. Д. Якубке, Х. Ешкайт ; пер. с нем. Н. П. Запеваловой, Е. Е. Максимова ; под ред. Ю. В. Митина. – М. : Мир, 1985. – 456 с.
111. Яшин, Я. И. Высокоэффективная жидкостная хроматография. Состояние и перспективы / Я. И. Яшин, А. Я. Яшин // Рос. хим. ж. - 2003. - Т. XLVII, № 1 – С. 64-79.
112. Adler-Nissen, J. Limited enzymic degradation of proteins: A new approach in the industrial application of hydrolases / J. Adler-Nissen // Journal of Chemical Technology and Biotechnology. – 1982. - Vol. 32, № 1. – P. 138–156.
113. Antiproliferative activity of fish protein hydrolysates on human breast cancer cell lines L. Picot [et al.]. // Process Biochemistry. – 2006. – Vol. 41, № 5. – P. 1217–1222.
114. Compositions free from proteins and peptides : patent 2751177 Франция МПК А 23 J 3/00, А 23 J 3/04 / Morelle J / ; заявитель Morelle Jean. - № 19960008890; заявл. 17.07.1996; опубл 23.01.1998.

115. Darewicz, M. The structure of milk proteins versus their functional properties / M. Darewicz, J. Dziuba // *Nauka.Technologia.Jakozc.* – 2005. – Vol. 2 (43). – P. 47-60.
116. Diniz, F.M. Influence of process variables on the hydrolysis of shark muscle protein / *Food Sci and Technol. Int.* – 1998. – Vol. 4, № 2. – P. 91-98.
117. Effect of casein hydrolysate on association properties of milk protein as seen by dynamic light scattering / Z. U. Haque [et al.] // *J. Agr. and Food Chem.* – 1993. – Vol. 41, № 3. – p. 203-207.
118. Emulsion Properties of Casein and Whey Protein Hydrolysates and the Relation with Other Hydrolysate Characteristics / C. van der Ven [et al.] // *J. Agric. Food Chem.* – 2001. – Vol. 49 (10). – P. 5005–5012.
119. Enzymatic hydrolysis of proteins from yellow fin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using Alcalase / F. Guérard [et al.]. // *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* – 2001. – Vol. 11, № 4–6. – P. 1051–1059.
120. Factors important to the gelation of whey protein concentrates / M. E. Mangino, J. H. Kim, J. A. Dunkerly, J. G. Zadow // *Food Hydrocolloids.* – 1987. - Vol. 1, №. 4. - P. 277-282.
121. Functional properties of soy protein hydrolysates obtained by selective proteolysis / K. Tsumuraa [et al.] // *Food Science and Technology.* – 2005. - Vol. 38, № 3, P. 255–261.
122. Hydrolysis of rapeseed protein isolates: Kinetics, characterization and functional properties of hydrolysates / G. Chabanon [et al.] // *Proc. Biochem.* - 2007. - Vol. 42, № 10. - P. 1419-1428.
123. Inclusion of size fractionated fishhydrolysate in high plant protein diets for Atlantic cod, *Gadus morhua* / A. Aksnes, B. Hope, O. Høstmark, S. Albrektsen // *Aquaculture.* – 2006. – Vol. 261, № 3. – P. 1102–1110.
124. Influence of the extent of enzymatic hydrolysis on the functional properties of proteinhydrolysate from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin / J. Wasswa [et al.]. // *Food Chemistry.* – 2007. - Vol. 104, № 4. – P. 1698–1704.

125. Kim, S.-K. Medicinal Foods from Marine Animals: Current Status and Prospects / S.-K. Kim, R. Pallela // *Advances in Food and Nutrition Research*. – 2012. - Vol. 65. – P. 1–9.

126. Kinetic description of proteolysis. Part 4. Hydrolysis kinetics of partial protein hydrolysates / M. M. Vorob'ev, L. S. Slobodyanikova, S. V. Vitt, V. K. Latov, V. M. Belikov // *Nahrung*. - 1987. – Vol. 31, № 8. - P. 777-782.

127. Klyachko, N. L. Bioorganic synthesis in reverse micelles and related systems / N. L. Klyachko, A. V. Levashov // *Current Opin. Colloid Interface Sci.* - 2003. - Vol. 8, № 2. - P. 179-186.

128. Kristinsson, H. G. Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties / H. G. Kristinsson, B. A. Rasco // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. – 2000. – Vol. 40, № 1. – P. 43-81.

129. Liceaga-Gesualdo, A. M. Functional Properties of Fish Protein Hydrolysate from Herring (*Clupea harengus*) / A. M. Liceaga-Gesualdo, E. C. Y. Li-Chan // *Food Science & Technology*. – 1999. – Vol. 64, № 6. - P.1000–1004.

130. Monastyrsky, K. Functional Nutrition: the foundation of absolute health and longevity. - Lyndhurst, USA: Ageless Press, 2002. – 340 p.

131. Moore, S. Chromatography aminoacids on sulfonated polystyrene resins / S. Moore, D. Spackman, W. Stein // *Analyt. Chem.* – 1958. – Vol. 30. – P. 1185-1190.

132. Mukhin, V. A. Enzymes and Enzymatic Hydrolysates from Invertebrates of the Barents Sea / V. A. Mukhin, V. Yu. Novikov // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2001. Vol. 37, № 5. – P. 538-542.

133. Muzaifa, M. Production of protein hydrolysates from fish by-product prepared by enzymatic hydrolysis / M. Muzaifa, N. Safriani, F. Zakaria // *Aquaculture, Aquarium, Conversation & Legislation. International Journal of the Bioflux Society*. 2012. – Vol. 5, № 1. - P. 36-39.

134. Ostlie, H. M. Autolysis of propionibacteria: Detection of autolytic enzymes by renaturing SDS-PAGE and additional buffer studies / M. O. Hilde, G. Vegarud,

T. Langsrud // *International Journal of Food Microbiology*. – 2007. – Vol. 117, № 2. – P. 167–174.

135. Pacheco-Aguilar, R. Functional properties of fish protein hydrolysates from Pacific whiting (*Merluccius productus*) muscle produced by a commercial protease / R. Pacheco-Aguilar, M. A. Mazorra-Manzano, J. C. Ramírez-Suárez // *Food Chemistry*. - 2008. – Vol. 109, № 4. – P. 782–789.

136. Paulov, Yu. V. Influence of technological processing on free amino acids content in meat of the *Chionoectes* crabs / Yu. V. Paulov, Z. P. Shvidkaya, T. A. Davletshina // *Izv. TINRO*. – 2006. – Vol.147. – P. 343-346.

137. Pecora, R. *Dynamic Light Scattering - Applications of Photon Correlation Spectroscopy* / R. Pecora. - Plenum Press, New York, 1985. – 420 p.

138. Piez, K. A. The Amino Acid Composition of Some Fish Collagens: The Relation between Composition and Structure / K. A. Piez, J. Gross // *The Journal of biological chemistry*. – 1960. - Vol. 235, № 4. - P. 995-998.

139. Preparation and characterization of whey protein hydrolysates: application in industrial whey bioconversion process / A. Perea, U. Ugalde, I. Rodriguez, J. Serra // *Enzyme and Microbial Technology*. – 1993. – Vol. 15, № 5. – P. 418–423.

140. Restricted enzymatic hydrolysis of legumin of broad beans (*Vicia faba* L.) by trypsin in concentrated solutions – control of hydrolysis process at the expense of change of enzyme-substrate ratio / A. N. Danilenko [et al.] // *Nahrung*. – 1993. – Vol. 37, № 1. – P. 46-52.

141. Schmide, M. K. Use of hydrolysates-based products in special medical diets / M. K. Schmide, S. L. Taylor, J. A. Nordlee // *Food Technology*. – 1994. - №10. – P. 77-85.

142. See, S. F. Optimization of enzymatic hydrolysis of Salmon (*Salmo Salar*) skin by Alkalase / S. F. See, L. L. Hoo, A. S. Babji // *International food research journal*. – 2011. – Vol. 18(4). – P. 1359-1365.

143. Shahidi F. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*) / F. Shahidi, X.-Q. Han, J. Synowiecki // *Food Chemistry*. – 1995. Vol. 53, № 3, P. 285–293.

144. Slizyte R. Enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products: Optimization of yield and properties of lipid and protein fractions / R. Slizyte, T. Rustad, I. Storr // *Process Biochemistry*. – 2005. - Vol. 40, № 12. – P.3680–3692.
145. Srere, P. A. Complexes of sequential metabolic enzymes / P. A. Srere // *Annual review of biochemistry*. - 1987. - Vol. 56. - P. 89-124.
146. Stability of emulsions formed using whey protein hydrolysate / S. O. Agboola [et al.] // *J. Agr. and Food Chem.* – 1998. - Vol. 46, № 1. – P. 84-90.
147. Study on Aqueous Enzymatic Extraction of Red Bean Protein / Q. Liu [et al.] // *Procedia Engineering*. - 2011. – Vol. 15. – P. 5035–5045.
148. Szpendowski, J. Hidrophobicity of milk proteins and their functional properties // *Przem. Spozyw.* - 1997. - Vol. 51, № 8. - P. 16-18.
149. Thermalstability of soy protein isolate and hydrolysate ingredients / M. Ryana [et al.] // *Food Chemistry*. – 2008. – Vol. 108, № 2. – P. 503–510.
150. Thiansilakul, Y. Compositions, functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from round scad (*Decapterus maruadsi*) / Y. Thiansilakul, S. Benjakul, F. Shahidi // *Food Chemistry*. – 2007. – Vol. 103, № 4. – P. 1385–1394.
151. Tsumura Kazunobu, Kugimiya Wataru, Hoshino Kumico A protein hydrolysate and process for producing same : patent 797928, Япония, МПК А23 G 1/00, А23 G 1/56 № 1996007443
152. Use of enzymes in hydrolysis of maize stalks / I. Valchev, S. Nenkova, P. Tsekova, V. Lasheva // *BioResources*. – 2009. - № 4 (1). – P. 285–291.
153. Vaintraub, A. Applying the increase in rate constants of cooperative proteolysis to the determination of transition curves of protein denaturation / A. Vaintraub, D. Morari. // *J. Biochem. Biophys. Methods*. - 2003. - Vol. 57, №3. - P. 191-201.
154. Wei-chung, L. A network perspective on the topological importance of enzymes and their phylogenetic conservation / L. Wei-chung [et al.] // *Bioinformatics*. – 2007. – Vol. 8:121. – P. 14–28.

155. Westermeier, R. *Electrophoresis in Practice* / R. Westermeier. – NY, USA : J. Wiley & Sons, 1993. – 350 p.

## Приложения

**Приложение 1. О внедрении результатов диссертационных исследований в учебный процесс**

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО  
ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ  
**МУРМАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ  
(ФГБОУ ВПО «МГТУ»)**

СОГЛАСОВАНО  
Первый проректор

УТВЕРЖДАЮ  
Проректор по УР

\_\_\_\_\_ Л.В. Геращенко  
«\_\_» \_\_\_\_\_ 2015 г.

\_\_\_\_\_ Б.Ф. Петров  
«\_\_» \_\_\_\_\_ 2015 г.

**АКТ****о внедрении результатов диссертационных исследований в учебный процесс**

1. **Наименование предложения внедрения:** Технологическая Инструкция (ТИ) по производству ферментативного белкового гидролизата из отходов рыбопереработки.

2. **Кем предложена разработка:** Широной Анастасией Юрьевной, старшим преподавателем кафедры экологии и защиты окружающей среды (в соавторстве с Ю.А. Кучиной, В.Ю. Новиковым и С.Р. Деркач)

3. **Краткая аннотация работы:** Технологическая Инструкция разработана на основе результатов исследования кинетических закономерностей ферментативного гидролиза белоксодержащего рыбного сырья и учитывает способ внесения ферментного препарата в реакционную смесь, а также его автолиз.

4. **Где и когда внедрено:** Технологическая Инструкция по производству рыбного ферментативного белкового гидролизата для микробиологической промышленности используется в учебном процессе МГТУ:

- в лабораторном практикуме дисциплины «Биохимия гидролитических ферментов» для магистров 2 курса, обучающихся по направлению «Биология»;

- в лекционном курсе дисциплины «Системы обращения с отходами» для бакалавров 4 курса, обучающихся по направлению «Техносферная безопасность».

5. **Учебно-методическая (научно-методическая) эффективность внедрения:** повышение уровня профессиональной и научной подготовки бакалавров направления «Техносферная безопасность», и магистров, обучающихся по направлению «Биология».

Протокол заседания кафедры \_\_\_\_\_ от «\_\_» \_\_\_\_\_ 2015. № \_\_\_\_\_

Директор ЕТИ

Л.А. Петрова



**Приложение 2.** Технологическая инструкция по получению ферментативного  
белкового гидролизата из отходов рыбопереработки

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
«Мурманский государственный технический университет»  
(ФГБОУ ВПО «МГТУ»)

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель ректора по науке и  
стратегическому развитию

\_\_\_\_\_ А.И. Кибиткин

дата

**ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ИНСТРУКЦИЯ**

по получению ферментативного белкового гидролизата  
из отходов рыбопереработки

183010, Мурманск,  
ул. Спортивная, д. 13

## Предисловие

### Сведения о технологической инструкции

1. РАЗРАБОТАНА Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Мурманский государственный технический университет» (ФГБОУ ВПО «МГТУ»)

2. УТВЕРЖДЕНА И ВВЕДЕНА В ДЕЙСТВИЕ Федеральным государственным бюджетным образовательным учреждением высшего профессионального образования «Мурманский государственный технический университет» (ФГБОУ ВПО «МГТУ») с «\_\_» \_\_\_\_\_ 2015 г.

3. ВВЕДЕНА ВПЕРВЫЕ

4. Настоящая технологическая инструкция действует в комплекте с ТУ9385-017-78095326-2006 «Панкреатический гидролизат рыбной муки».

Настоящая технологическая инструкция не может быть полностью или частично воспроизведена, тиражирована и распространена в качестве официального документа без разрешения Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Мурманский государственный технический университет» (ФГБОУ ВПО «МГТУ»)

## Технологическая инструкция по получению ферментативного белкового гидролизата из отходов рыбопереработки

Настоящая инструкция предусматривает порядок операций в процессе получения ферментативного белкового гидролизата из отходов рыбопереработки, соответствующего ТУ 9385-017-78095326-2006 «Панкреатический гидролизат рыбной муки».

### Основные положения

#### 1 Сырье и материалы

1.1 Для изготовления ферментативного белкового гидролизата использовать отходы промысла и переработки Атлантической трески (ТУ 9267-142-79036538-2006 «Отходы пищевые от разделки рыбы, мороженые» и другие нормативные документы).

1.2 Материалы по качеству должны соответствовать требованиям нормативно-технической документации, приведённой в таблице 1.

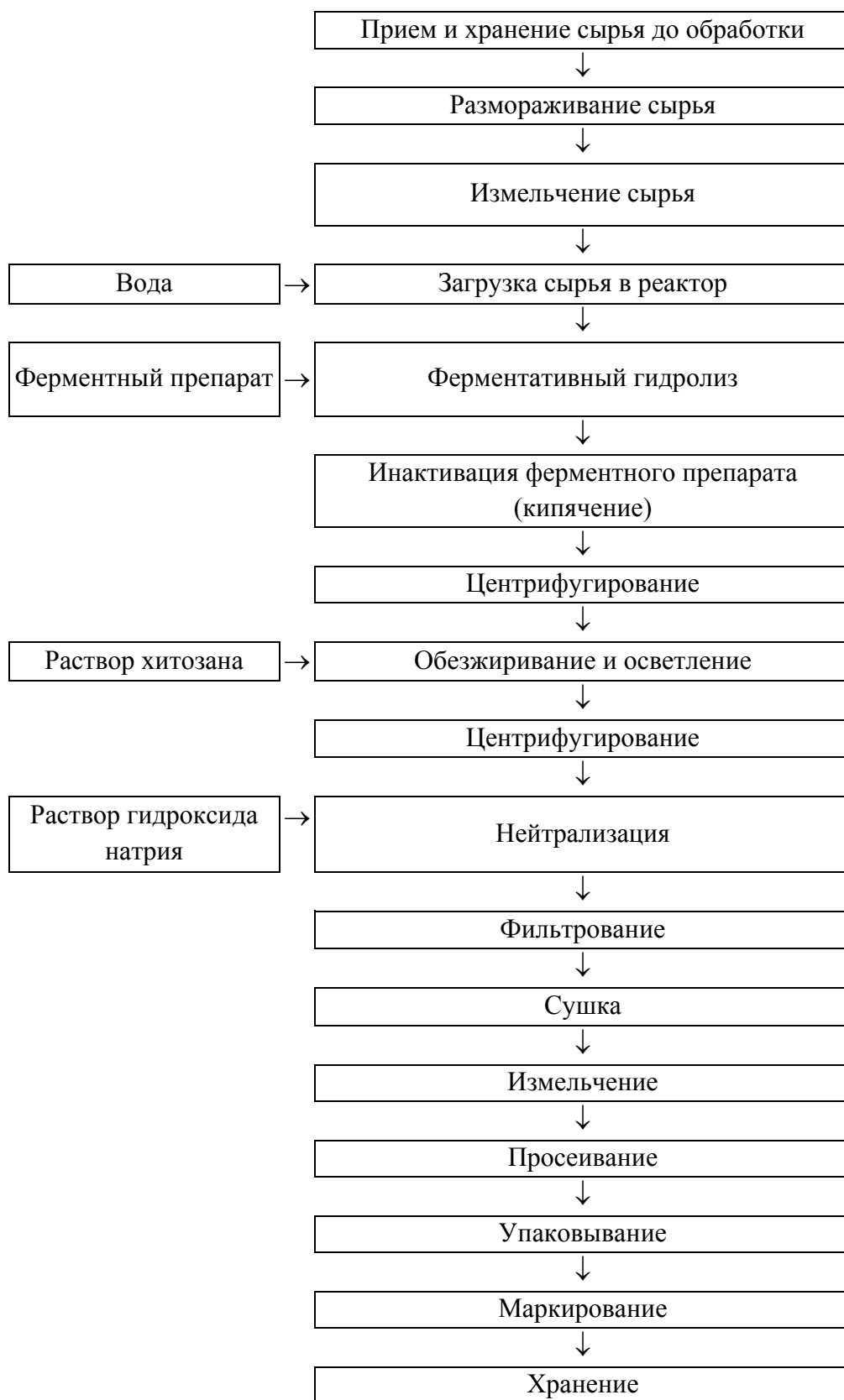
Таблица 1 - Материалы и нормативная документация к ним

Препарат ферментный полуфабрикат	ТУ 9280-026-00472182-04
Кислота соляная (химически чистая)	ГОСТ 3118-77
Натрия гидроокись (химически чистая)	ГОСТ 4328-77
Хитозан	ТУ 2321-005-63732773-2012
Вода питьевая	СанПин 2.1.4.1074-01

1.3 Ферментативный белковый гидролизат изготавливать с соблюдением санитарных норм и правил, утвержденных в установленном порядке.

«Правила безопасности для производства микробиологической продукции» утверждены Госгортехнадзором РФ и ГОСТ 12.3.002-75.

## 2 Схема технологического процесса



### 3 Описание технологического процесса

#### 3.1 Размораживание сырья

Мороженое сырье направить на воздушное размораживание. Воздушное размораживание проводить при температуре воздуха  $(12\pm 8)$  °С. Размораживание считать законченным, когда температура в блоке сырья достигнет 0 - минус 3 °С. Размороженное сырье направить на измельчение.

#### 3.2 Измельчение сырья

Измельчение сырья проводить в устройстве любой конструкции (волчке, куттере и др.). Диаметр частиц измельченного сырья должен быть не более 3 мм. Измельченное сырье направить в реактор для ферментативного гидролиза.

#### 3.3 Ферментативный гидролиз

В аппарат из щелоче- и кислотостойкого материала с рубашкой для обогрева и перемешивающим устройством загрузить воду и измельченное сырье в соотношении 1:1. Смесь тщательно перемешать и нагреть до температуры  $(50\pm 2)$  °С. При необходимости довести рН до значения  $6,8\pm 2$ .

Внести в нагретую смесь ферментный препарат. Соотношение масс воды, сырья и ферментного препарата 1:1:0,006.

Повторное внесение аналогичного количества ферментного препарата производить через 30 минут после начала гидролиза.

Процесс ферментативного гидролиза проводить, поддерживая температуру  $(50\pm 2)$  °С, при постоянном перемешивании в течение 6 ч.

#### 3.4 Инактивация ферментного препарата (кипячение)

После окончания процесса ферментативного гидролиза реакционную смесь нагреть до температуры  $(95\pm 2)$  °С и выдержать при этой температуре и постоянном перемешивании в течение 15 минут.

Не выключая перемешивающее устройство, смесь подать на центрифугу для отделения нерастворимой части.

#### 3.5 Центрифугирование

Центрифугирование смеси проводить на осадительной шнековой центрифуге типа ОГШ. Нерастворимую часть собрать и направить на утилизацию. Надосадочную жидкость собрать в аппарат из щелочестойкого материала и направить на обезжиривание и осветление.

### 3.6 Приготовление 18 %-ного раствора соляной кислоты

Для приготовления 100 кг 18 %-ного раствора соляной кислоты в аппарат из кислотостойкого материала с перемешивающим устройством залить 50 кг (50 дм<sup>3</sup>) воды с температурой  $(18\pm 5)$  °С и вакуумом закачать при перемешивании 50 кг (42 дм<sup>3</sup>) концентрированной соляной кислоты с массовой долей 37,2% и плотностью 1,19 кг/дм<sup>3</sup>. Раствор перемешать в течение 30 минут.

### 3.7 Приготовление 0,1 моль/дм<sup>3</sup> раствора соляной кислоты

Для приготовления 100 кг 0,1 моль/дм<sup>3</sup> раствора соляной кислоты в аппарат из кислотостойкого материала с перемешивающим устройством залить 100 кг (100 дм<sup>3</sup>) воды с температурой  $(18\pm 5)$  °С и загрузить при перемешивании 360 г (0,3 дм<sup>3</sup>) концентрированной соляной кислоты с массовой долей 37,2% и плотностью 1,19 кг/дм<sup>3</sup>. Раствор перемешать в течение 30 минут.

### 3.8 Приготовление 1 %-ного раствора хитозана

Для приготовления 100 кг 1 %-ного раствора хитозана в аппарат из кислотостойкого материала с перемешивающим устройством залить 99 кг (99 дм<sup>3</sup>) 0,1 моль/дм<sup>3</sup> раствора соляной кислоты с температурой  $(18\pm 5)$  °С и при перемешивании постепенно засыпать 1 кг хитозана. Смесь перемешать до полного растворения хитозана от 3 до 24 ч.

### 3.9 Приготовление 20 %-ного раствора гидроксида натрия

Для приготовления 100 кг 20 %-ного раствора гидроксида натрия в аппарат из щелочестойкого материала с перемешивающим устройством загрузить 80 кг (80 дм<sup>3</sup>) воды с температурой  $(18\pm 5)$  °С и при перемешивании постепенно засыпать 20 кг гидроксида натрия. Смесь перемешать до полного растворения гидроксида натрия.

### 3.10 Обезжиривание и осветление

В аппарат из щелоче- и кислотостойкого материала с перемешивающим устройством загрузить гидролизат после центрифугирования. При необходимости добавить при перемешивании 18 %-ный раствор соляной кислоты до значения рН смеси, равного  $(6,2\pm 0,2)$ .

Затем в нейтрализованную смесь добавить при перемешивании 1 %-ный раствор хитозана.

Соотношение массы сырья и раствора хитозана 1:0,1. Полученную смесь перемешать в течение 15-20 минут.

Затем при перемешивании добавить 20 %-ный раствор гидроксида натрия, доведя рН смеси до значения  $(8,2 \pm 0,2)$ . Полученную смесь перемешать в течение 15 минут.

Не выключая перемешивающее устройство, образовавшуюся суспензию направить на центрифугирование

### 3.11 Центрифугирование

Центрифугирование смеси проводить на осадительной шнековой центрифуге типа ОГШ. Нерастворимую часть собрать и направить на утилизацию. Надосадочную жидкость собрать в аппарат из щелочестойкого материала и направить на обезжиривание и осветление.

### 3.12 Нейтрализация

В аппарат из щелочестойкого материала с перемешивающим устройством загрузить гидролизат после центрифугирования. При перемешивании добавить 18 %-ный раствор соляной кислоты до значения рН фильтрата, равного  $(7,2 \pm 0,2)$ .

Нейтрализованный раствор гидролизата направить на фильтрование для отделения осадка.

### 3.13 Фильтрование

Фильтрование проводить на нутч-фильтре любой конструкции или через слой фильтрующего материала (фильтровальная бумага).

Прозрачный очищенный гидролизат собрать в емкость из щелочестойкого материала и направить на сушку.

### 3.14 Сушка

Очищенный гидролизат сушить в распылительной сушилке, сушилке с инертным носителем в кипящем слое или другом устройстве, обеспечивающем сохранность продукта, до массовой доли воды в продукте не более 7 %.

Гидролизат сушить при температуре не выше 60 °С.

Окончание сушки устанавливает лаборатория. Высушенный гидролизат при необходимости направить на измельчение и просеивание.

### 3.15 Измельчение

При необходимости гидролизат измельчать на дробилке любой конструкции до размера частиц не более 0,2 мм.

### 3.16 Просеивание

Измельченный гидролизат просеивать через сито с размером ячеек 0,2 мм. Оставшийся на сите гидролизат направить на повторное измельчение со следующей партией продукта.

### 3.17 Упаковывание

3.17.1 Упаковывать сушеный гидролизат по ГОСТ 7630-96 в пакеты из герметичных полимерных материалов с предельной массой продукта не более 10 кг.

3.17.2 Гидролизат в пакетах из полимерных материалов, упаковывать в:

- ящики из гофрированного картона по ГОСТ 13516-86, ОСТ 15-395-96 предельной массой продукта 24 кг;
- ящики полимерные многооборотные по ОСТ 15-384-95 предельной массой продукта 24 кг.

Полимерные ящики закрыть съемными крышками.

3.17.3 Предельные отклонения массы нетто  $\pm 1\%$ .

3.17.4 Тара и упаковочные материалы, используемые для упаковывания продукции, должны быть прочными, чистыми, сухими, без постороннего запаха и изготовлены из материалов, разрешенных для контакта с пищевыми продуктами органами государственного санитарно-эпидемиологического надзора.

3.17.5 Возможно использовать другие виды тары и упаковки, разрешенных органами государственного санитарно-эпидемиологического надзора для контакта с пищевыми продуктами, соответствующие санитарным требованиям, требованиям нормативных документов и обеспечивающие сохранность и качество продукции при транспортировании и хранении.

### 3.18 Маркирование

Маркировать тару с продукцией по ГОСТ 7630-96.

### 3.19 Хранение

Хранить ферментативный белковый гидролизат в сухих вентилируемых помещениях при температуре не выше  $25^{\circ}\text{C}$  не более 6 месяцев с даты изготовления.



#### 4 Метрологическое обеспечение технологического процесса

4.1 Контроль массы продукции, сырья и компонентов по всему технологическому процессу определять на весах для статического взвешивания по ГОСТ 23676-79, ГОСТ 23711-79 с наибольшими пределами взвешивания, обеспечивающими контроль массы.

4.2 Допускается определение массы жидких компонентов объемным методом с применением градуированных мерных емкостей и расходомеров с соответствующими пределами и заданной точностью измерений. Пересчет массы на объем производить с учетом плотности жидкого компонента.

4.3 Температуру растворов, воздуха определять приборами дистанционного контроля температуры класса точности не ниже 1,5 или термометрами техническими по ГОСТ 2823-78 с ценой деления 1 °С в защитных оправах с пределами измерений, обеспечивающими контроль заданных температур.

4.4 Продолжительность операций по всему технологическому циклу контролировать часами механическими с минутным отсчетом.

4.5 Контроль влажности воздуха в камерах хранения осуществлять психрометрами универсальными бытовыми типа ПБУ, аспирационными по ТУ 25-1607.054-85 или приборами дистанционного контроля влажности воздуха, обеспечивающими контроль заданного параметра.

4.6 Контроль активности водородных ионов раствора осуществлять с помощью иономера, оснащенного хлорсеребряным и платиновым электродами.

4.7 Контроль качества промежуточных продуктов и готового препарата проводить в соответствии с методами: показатели качества ферментативного белкового гидролизата определять по ТУ 9385-017-78095326-2006 «Панкреатический гидролизат рыбной муки».

4.8 Массовую долю воды в продукте определять по ГОСТ 7636-85 или с помощью влагомеров различной конструкции, обеспечивающих необходимый диапазон измерений массовой доли воды и необходимую точность измерений.

4.9 Вакуум в процессе отделения осадка контролировать вакуумметрами по ГОСТ 2405-80 с пределами измерений от минус 1 до 0 кгс/см<sup>2</sup>.

4.10 Контроль параметров осуществлять исправными средствами измерений с действующими сроками поверки.

## 5 Контроль процесса производства

Таблица 2

### Схема контроля технологического процесса производства ферментативного белкового гидролизата

Точки контроля	Контролируемый параметр	Характеристика (значение) контролируемого параметра	Метод контроля
1. Приём сырья, материалов и тары	Качество сырья, материалов, тары	ТУ 9228-001-04703997-93	Физический, химический, визуальный
2. Приготовление растворов	Масса вещества, кг	В соответствии с данной ТИ	Физический
3. Хранение сырья	Сроки хранения	В соответствии с требованиями НД	Визуальный, Физический
4. Размораживание сырья	Температура при размораживании, °С Температура в блоке сырья при окончании размораживания, °С	12±8 -3 - 0	Физический Физический
5. Измельчение сырья	Размер частиц, мм, не крупнее	3	Физический
6. Ферментативный гидролиз сырья	Температура гидролизуемой смеси, °С, Массовое соотношение воды, сырья и ферментного препарата Время внесения дополнительной порции ферментного препарата, ч Массовое соотношение порции ферментного препарата и сырья Общее время гидролиза, ч.	50±2 1:1:0,006 0,5 1:0,006 6	Физический Физический Физический Физический Физический
7. Инактивация ферментного препарата	Температура инактивации, °С Время инактивации, мин.	95±2 15	Физический Физический
8. Центрифугирование	Разделение раствора гидролизата	Образование	

гидролизата		плотного осадка	Визуальный
9. Обезжиривание гидролизата	Водородный показатель смеси, рН Массовое соотношение гидролизата и хитозана	6,2±0,2 1:0,1	Химический Физический
10. Осветление	Водородный показатель смеси, рН Цвет раствора (фильтрата)	8,2±0,2 Бесцветный или слабое желтое окрашивание	Химический Визуальный
11. Центрифугирование гидролизата	Разделение раствора гидролизата	Образование плотного осадка	Визуальный
12. Нейтрализация	Водородный показатель воды, рН	7,2±0,2	Химический
13 Сушка	Температура, °С, не выше Массовая доля влаги, %	60 4-7	Физический Химический
14. Измельчение гидролизата	Размер частиц, мм, не крупнее	0,2	Физический
15. Просеивание	Размер ячеек сита, мм	0,2	Физический
15 Упаковывание	Правильность упаковки	ГОСТ 15-390-95 ГОСТ 17811-78	Визуальный
16 Маркирование	Правильность маркировки	ГОСТ 7625-86 ГОСТ 18510-87 ГОСТ 14192-92	Визуальный
17 Хранение	Сроки хранения	В соответствии с требованиями НД	Визуальный, Физический

## 6 Санитарная обработка

Санобработка и мойка производственных помещений, инвентаря, оборудования, тары, проводится в соответствии с инструкциями: СанПиН 2.3.4.050-96 и инструкцией по санитарной обработке технологического оборудования на рыбообрабатывающих предприятиях и судах.

## 7 Требования по безопасности

7.1 Технологический процесс производства ферментативного белкового гидролизата должен соответствовать требованиям технологической безопасности по ГОСТ 12.3.002-75, ОСТ 15-240-80.

7.2 Применяемое оборудование должно соответствовать требованиям ГОСТ 12.2.003-91, ОСТ 15-240-80, санитарно-эпидемиологическим правилам СП 2.2.2.1327-03 «Гигиенические требования к организации технологических процессов, производственному оборудованию и рабочему инструменту», ГН 2.3.3.972-00 «Предельно допустимые количества химических веществ, выделяющихся из материалов, контактирующих с пищевыми продуктами».

7.3 Параметры микроклимата должны соответствовать требованиям СанПиН 2.2.4.548-96 «Гигиенические требования к микроклимату производственных помещений».

7.4 Показатели, характеризующие освещённость на рабочих местах, должны соответствовать требованиям СанПиН 2.2.1./2.1.1.1278-03 «Гигиенические требования к естественному, искусственному и совмещённому освещению жилых и общественных зданий».

7.5 Работники перед поступлением на работу и работающие на предприятии должны проходить предварительное и периодическое медицинское обследование в соответствии с действующими приказами Минздрава РФ. Работники должны проходить гигиеническую подготовку при поступлении на работу и в процессе работы один раз в два года.

7.6 Производство, хранение и транспортирование ферментативного белкового гидролизата должны обеспечивать требования в сфере охраны окружающей среды, устанавливаемые Федеральным законом «Об охране окружающей природной среды», «Об отходах производства и потребления» и другими нормативными документами, утверждёнными в установленном порядке.

7.7 Изготовитель продукции должен обеспечивать выполнение требований нормативных и законодательных документов в области обращения с отходами производства и потребления.

7.8 Организацию и проведение производственного контроля за соблюдением санитарных правил и выполнением санитарно-профилактических мероприятий при производстве D(+)-глюкозамина гидрохлорида осуществлять в соответствии с санитарными правилами СП 1.1.1058-01 «Организация и проведение производственного контроля за соблюдением правил и выполнением санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий», СП 1.1.2193-07 «Организация и проведение производственного контроля за соблюдением правил и выполнением санитарно-

противоэпидемических (профилактических) мероприятий» (изменения и дополнения №1 к СП 1.1.1058-01), утверждёнными Постановлением Главного государственного врача РФ 27.03.2007.

РАЗРАБОТАНО:

Старший преподаватель  
кафедры экологии и ЗОС  
МГТУ

\_\_\_\_\_

личная подпись, дата

А.Ю. Широина

Научный сотрудник кафедры  
химии МГТУ

\_\_\_\_\_

личная подпись, дата

Ю.А. Кучина

Старший научный сотрудник  
лаборатории биохимии и  
технологии ПИНРО, к.х.н.

\_\_\_\_\_

личная подпись, дата

В.Ю. Новиков

Зав. кафедрой химии МГТУ,  
д.х.н., профессор

\_\_\_\_\_

личная подпись, дата

С.Р. Деркач

### Приложение 3. Результаты исследования белкового гидролизата

#### Результаты

##### по исследованию белкового гидролизата для МГТУ (25.07.2012).

Исследование белкового гидролизата проводилось в лаборатории микробиологии на соответствие требованиям Фармакопейной статьи (ФС 42 – 3378 -97). Гидролизат для исследования поступил в жидком виде.

Бульон и питательный агар, приготовленные из этого гидролизата, были прозрачные, светло-коричневого цвета.

Исследования были проведены с использованием тест-культур: *Staphylococcus aureus* Wood – 46, *Escherichia coli* 055 K59 3912/41, *Pseudomonas aeruginosa* 27/99, *Shigella flexneri* la 8516 и *Salmonella typhi* H – 901, которые были получены из ГИСК им. Л.А. Тарасевича. Используемые для контроля среды тест-штаммы должны быть типичными по культуральным, морфологическим, биологическим и серологическим свойствам.

Оценка качества питательных сред проводилась по следующим показателям:

- чувствительности к росту тест-культур;
- стабильности основных морфологических, культуральных, биохимических (образование индола и сероводорода) свойств;
- по эффективности роста.

Питательный бульон должен обеспечивать во всех засеянных пробирках рост тест-культур при посеве 0,5 мл микробной взвеси для *Escherichia coli* 055 K59 3912/41 и *Pseudomonas aeruginosa* 27/99 – из разведения  $10^{-7}$  через 20-24 часа инкубации, для *Staphylococcus aureus* Wood – 46 – из разведения  $10^{-6}$  не позднее 48 часов инкубации при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  в виде диффузного помутнения среды

Питательный бульон на основе исследуемого гидролизата должен обеспечивать во всех засеянных пробирках образование индола и сероводорода ( $\text{H}_2\text{S}$ ) тест-культурами *Shigella flexneri* la 8516 и *Salmonella*

typhi H – 901 соответственно через 20-24 часа инкубации при температуре (37.±1) °С.

В качестве контроля использовали питательный бульон, приготовленный из коммерческого ГРМ-бульона.

Результаты чувствительности тест-культур на испытуемых средах отображены в таблице 1.

**Таблица 1**

Характеристика роста тест-культур на питательном бульоне с гидролизатом.

Наименование	Разведение	ТЕСТ - ШТАММ				
		<i>Escherihia coli 055 K59 3912/41</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa 27/99</i>	<i>Staphilococcus aureus Wood-46</i>	<i>Shigella Flexneri 1a 85/16</i>	<i>Salmonella Typhi H-901</i>
Белковый гидролизат	10 <sup>-6</sup>	Рост	Рост	Рост	Индол	H <sub>2</sub> S
	10 <sup>-7</sup>	Рост	Рост	Рост	Индол	H <sub>2</sub> S
	10 <sup>-8</sup>	Рост	Рост	Рост	Индол	H <sub>2</sub> S
Контроль	10 <sup>-6</sup>	Рост	Рост	Рост	Индол	H <sub>2</sub> S
	10 <sup>-7</sup>	Рост	Рост	Рост	Индол	H <sub>2</sub> S
	10 <sup>-8</sup>	Рост	Рост	Рост	Индол	H <sub>2</sub> S

Питательный агар на основе белкового гидролизата должен обеспечивать рост тест-культур сопоставимый с контролем. В качестве контроля использовался коммерческий питательный агар.

Результаты посева тест-культур на питательные агары представлены в таблице 2.

Таблица 2

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ ВЫРОСШИХ КОЛОНИЙ НА КОММЕРЧЕСКОМ ПИТАТЕЛЬНОМ АГАРЕ  
И ПИТАТЕЛЬНОМ АГАРЕ С БЕЛКОВЫМ ГИДРОЛИЗАТОМ.

Разведение и засеваемый объем	КОММЕРЧЕСКИЙ ПИТАТЕЛЬНЫЙ АГАР			ПИТАТЕЛЬНЫЙ АГАР С БЕЛКОВЫМ ГИДРОЛИЗАТОМ		
	<i>Escherichia coli</i> 055 K59 3912/41	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27/99	<i>Staphylococcus aureus</i> Wood-46	<i>Escherichia coli</i> 055 K59 3912/41	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27/99	<i>Staphylococcus aureus</i> Wood-46
$10^{-6}$ / 0,1 МЛ.	$8,4 \times 10^8$	$7,7 \times 10^8$	$7,8 \times 10^8$	$7,0 \times 10^8$	$7,4 \times 10^8$	$7,0 \times 10^8$
$10^{-7}$ / 0,5 МЛ.	$8,0 \times 10^8$	$8,0 \times 10^8$	$7,5 \times 10^8$	$7,5 \times 10^8$	$7,0 \times 10^8$	$6,5 \times 10^8$
$10^{-8}$ / 1,0 МЛ.	$8,8 \times 10^8$	$9,2 \times 10^8$	$7,9 \times 10^8$	$7,1 \times 10^8$	$6,0 \times 10^8$	$7,5 \times 10^8$
ИТОГО:	$8,4 \times 10^8$	$8,3 \times 10^8$	$7,7 \times 10^8$	$7,2 \times 10^8$	$6,8 \times 10^8$	$7,0 \times 10^8$



Таблица 3

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ ВЫРОСШИХ КОЛОНИЙ НА КОММЕРЧЕСКОМ ПИТАТЕЛЬНОМ АГАРЕ И ПИТАТЕЛЬНОМ АГАРЕ С БЕЛКОВЫМ ГИДРОЛИЗАТОМ (ГИДРОЛИЗАТ ПОЛУЧЕН МОДИФИЦИРОВАННЫМ СПОСОБОМ)

Разведение и засеваемый объем	КОММЕРЧЕСКИЙ ПИТАТЕЛЬНЫЙ АГАР				ПИТАТЕЛЬНЫЙ АГАР С БЕЛКОВЫМ ГИДРОЛИЗАТОМ			
	<i>Escherichia coli</i> 055 K59 3912/41	<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> 27/99	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> Wood-46	<i>Escherichia coli</i> 055 K59 3912/41	<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> 27/99	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> Wood-46	<i>Escherichia coli</i> 055 K59 3912/41	<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> 27/99
$10^{-6} / 0,2$ МЛ	$6,3 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8$	$9,8 \times 10^8$	$1,0 \times 10^9$	$1,2 \times 10^8$	$9,5 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$	$9,5 \times 10^8$
$10^{-7} / 0,2$ МЛ	$6,5 \times 10^8$	$4,8 \times 10^8$	$1,0 \times 10^9$	$9,8 \times 10^8$	$5,0 \times 10^8$	$1,0 \times 10^9$	$5,0 \times 10^8$	$1,0 \times 10^9$
$10^{-8} / 0,2$ МЛ	$1,0 \times 10^9$	$5,3 \times 10^8$	$1,0 \times 10^9$	$1,0 \times 10^9$	$6,0 \times 10^8$	$1,0 \times 10^9$	$6,0 \times 10^8$	$1,0 \times 10^9$
Итого:	$7,6 \times 10^8$	$3,8 \times 10^8$	$9,9 \times 10^8$	$9,9 \times 10^8$	$4,1 \times 10^8$	$9,8 \times 10^8$	$4,1 \times 10^8$	$9,8 \times 10^9$

На основании полученных результатов роста тест-культур на питательном бульоне и агаре, приготовленных на основе белкового гидролизата, можно сделать следующий вывод:  
питательные среды, приготовленные на основе белкового гидролизата отвечают требованиям ФС 42-3378-97.

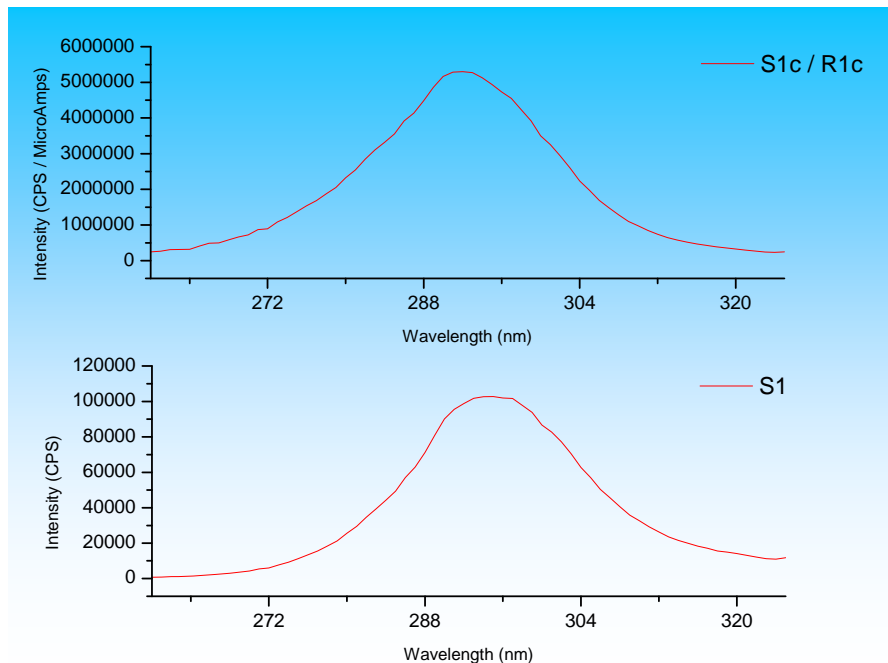


Т.И.Молчановская

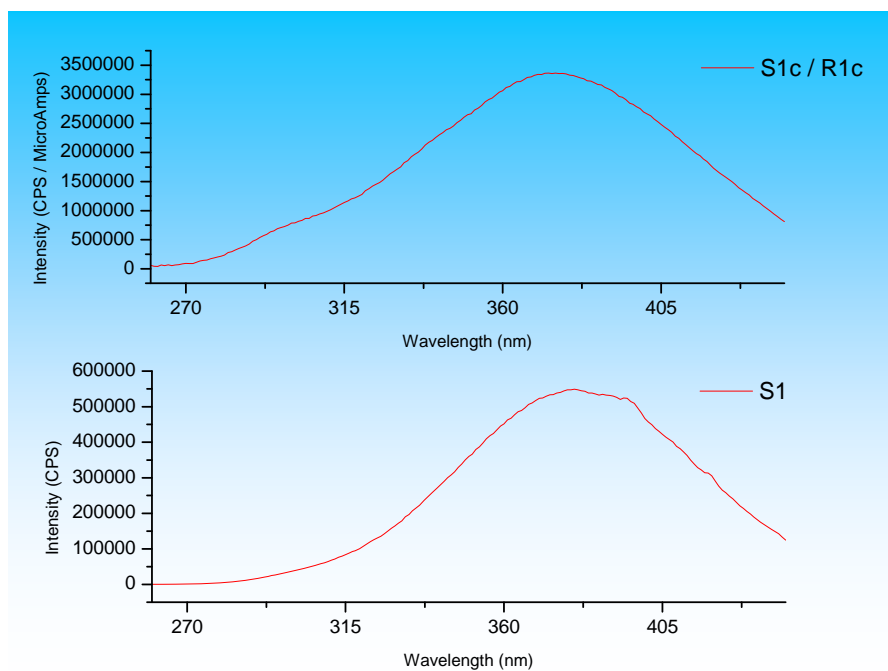
## Приложение 4. Данные люминисцентной спектроскопии негидролизованного рыбного сырья и полученных из него ферментативных белковых гидролизатов

### Образец 1. Негидролизованный белок

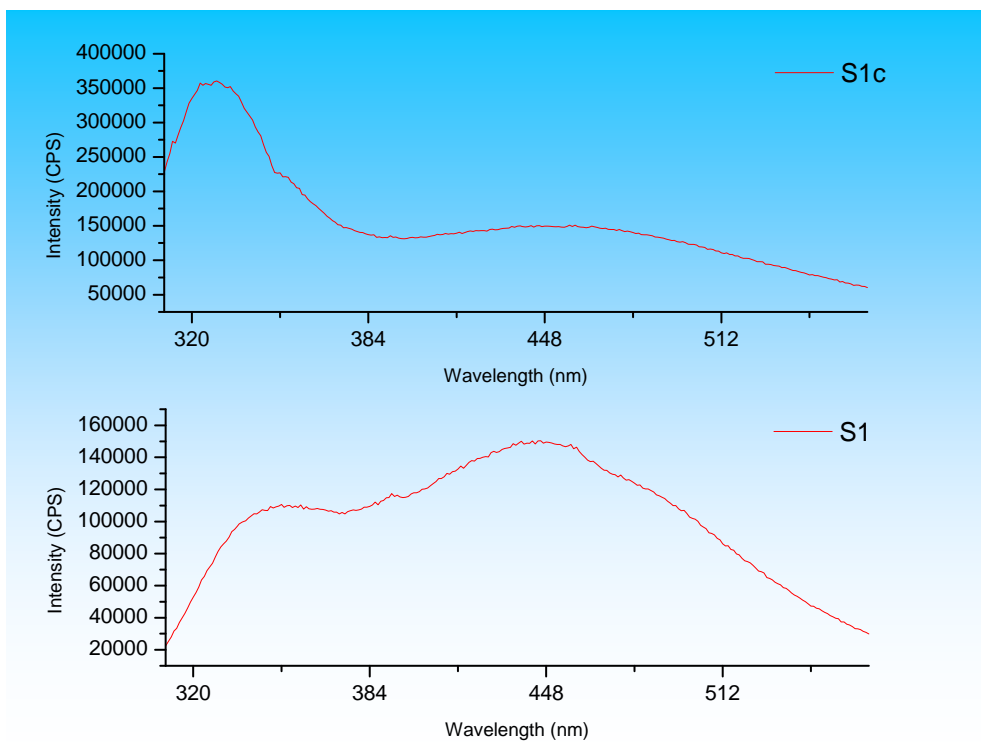
1. Ex 335. Спектр возбуждения измерен на длине волны люминесценции 335 нм



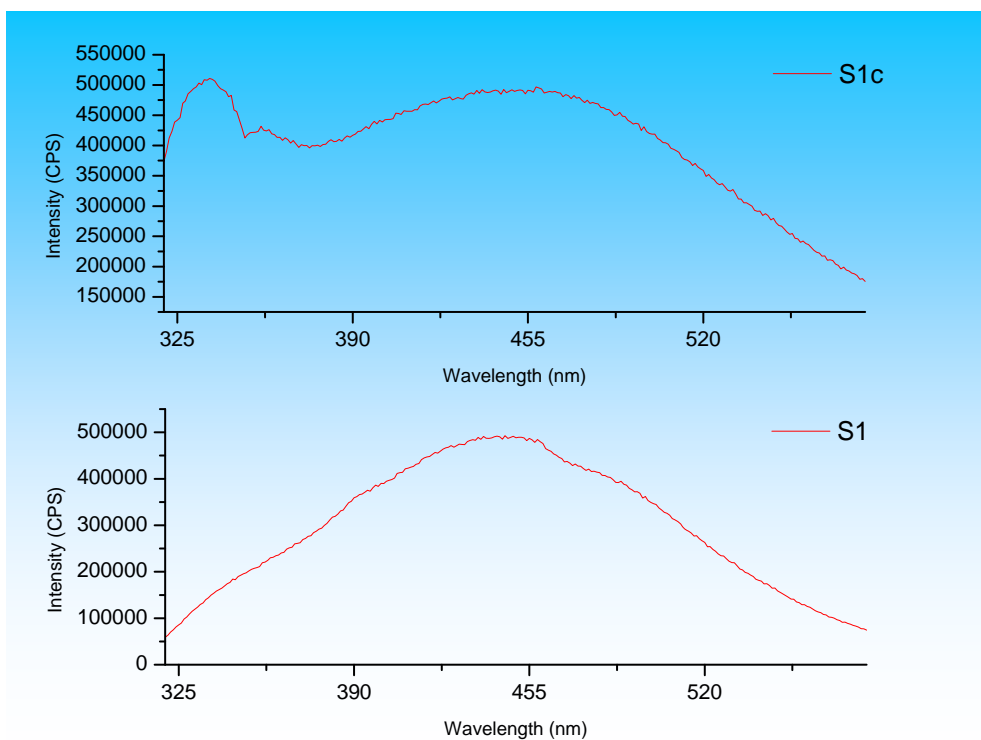
2. Ex 450. Спектр возбуждения измерен на длине волны люминесценции 450 нм



3. Em under 290. Спектр люминесценции измерен при длине волны возбуждения 290 нм

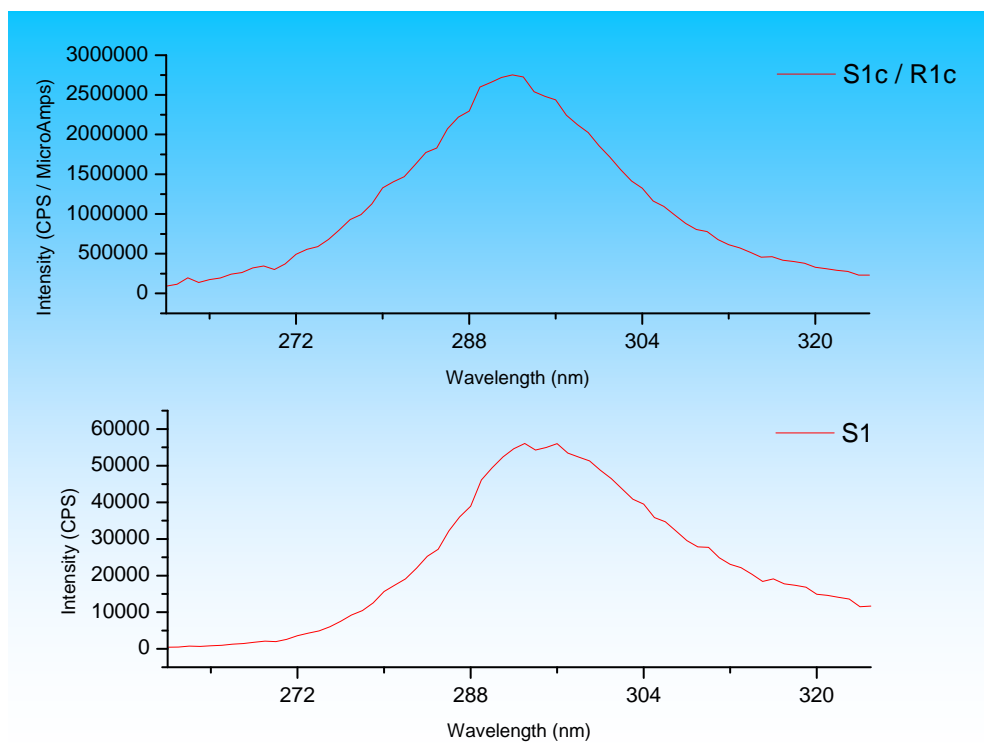


4. Em under 300. Спектр люминесценции измерен при длине волны возбуждения 300 нм

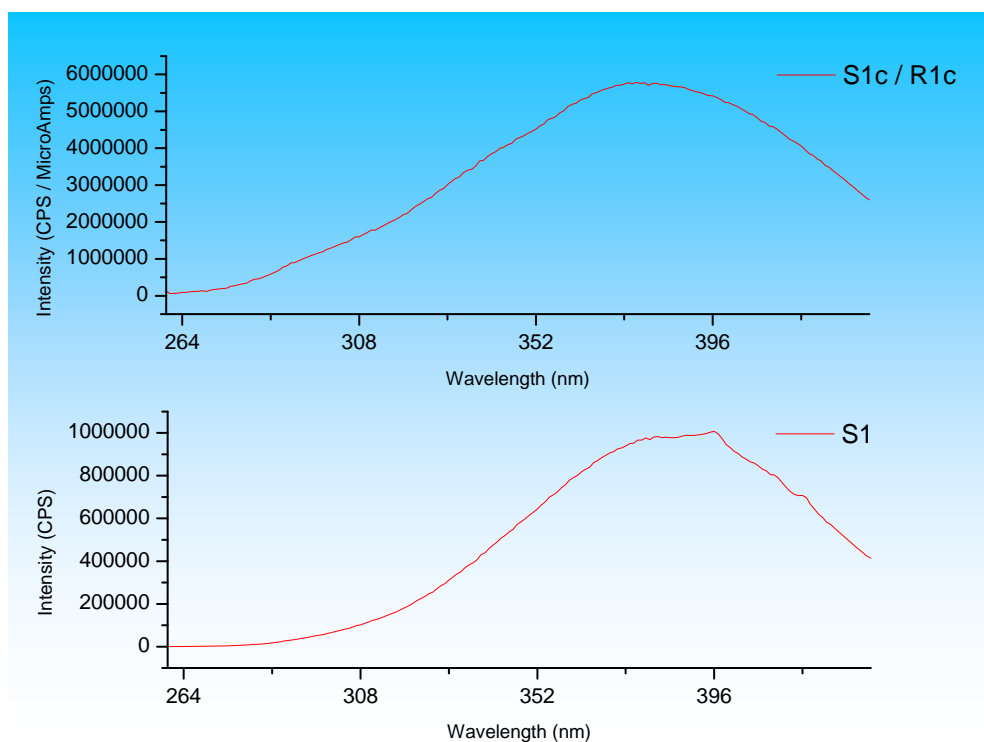


**Образец 2. Гидролизат, полученный при однократном внесении ФП**

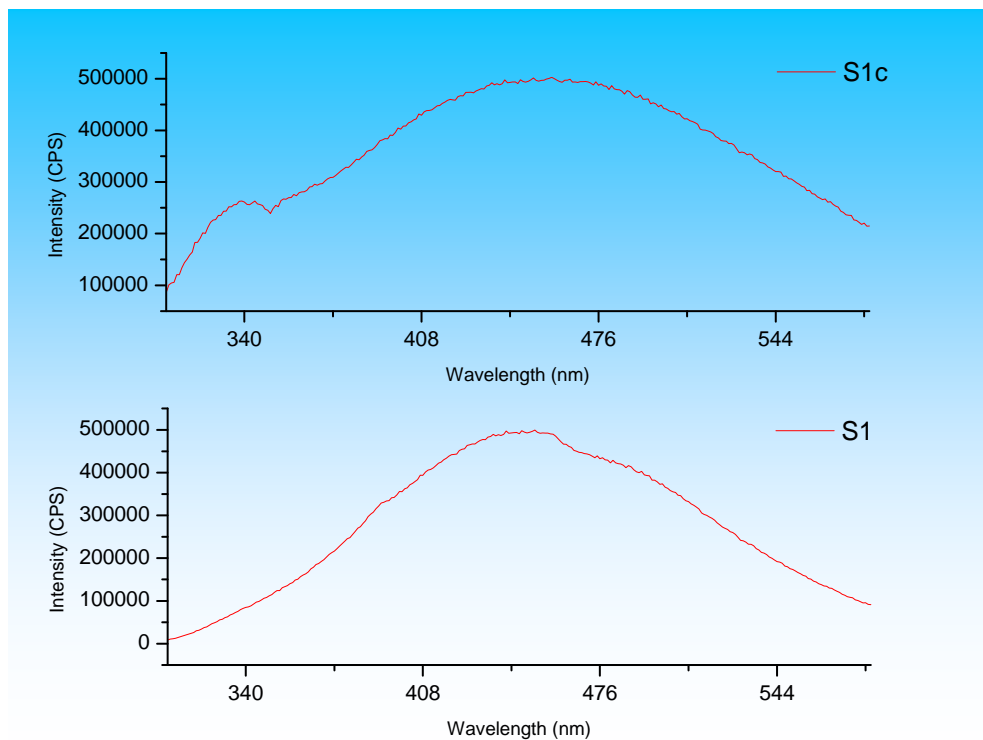
1. Ex 335. Спектр возбуждения измерен на длине волны люминесценции 335 нм



2. Ex 455. Спектр возбуждения измерен на длине волны люминесценции 455 нм

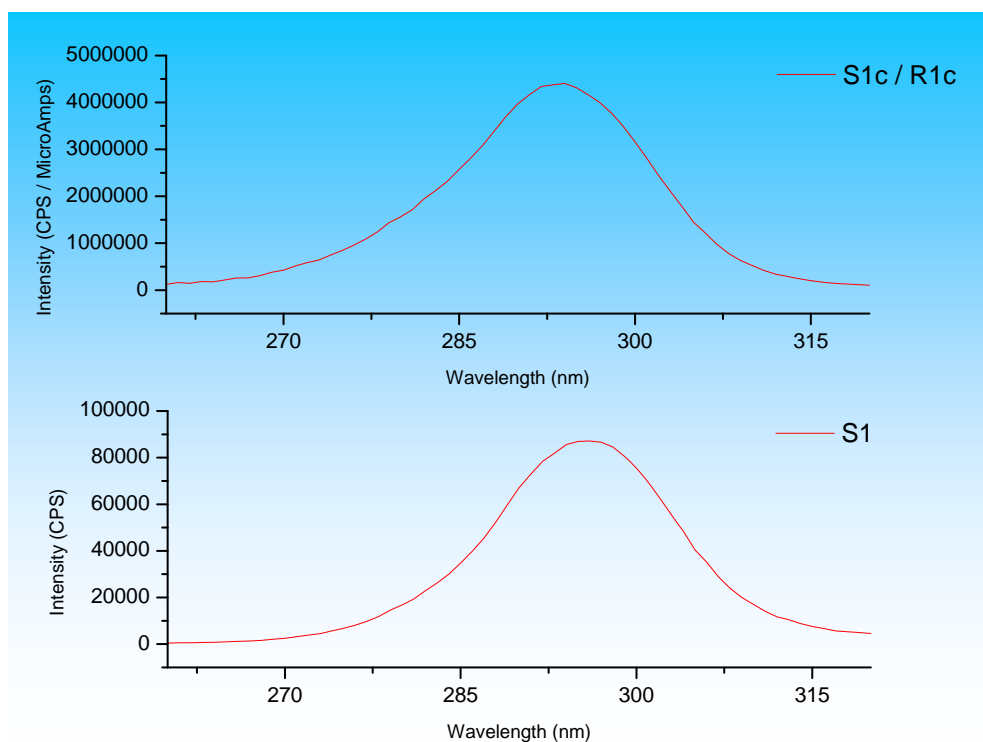


### 3. Em under 300. Спектр люминесценции измерен при длине волны возбуждения 300 нм

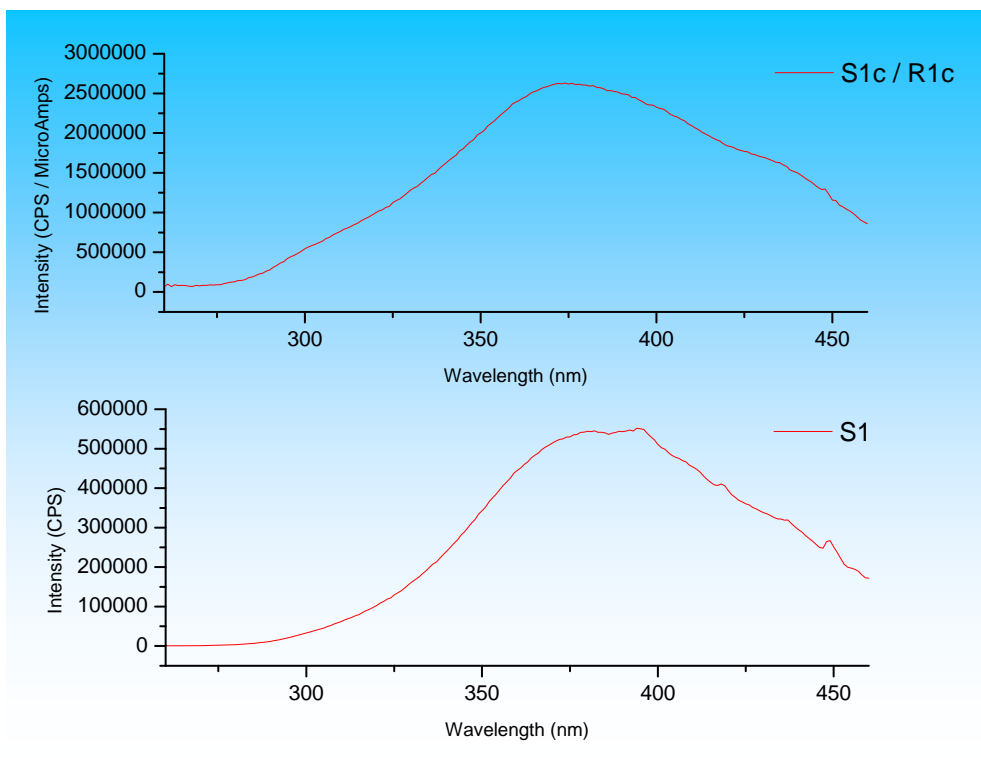


### Образец 3. Гидролизат, полученный при многократном внесении ФП

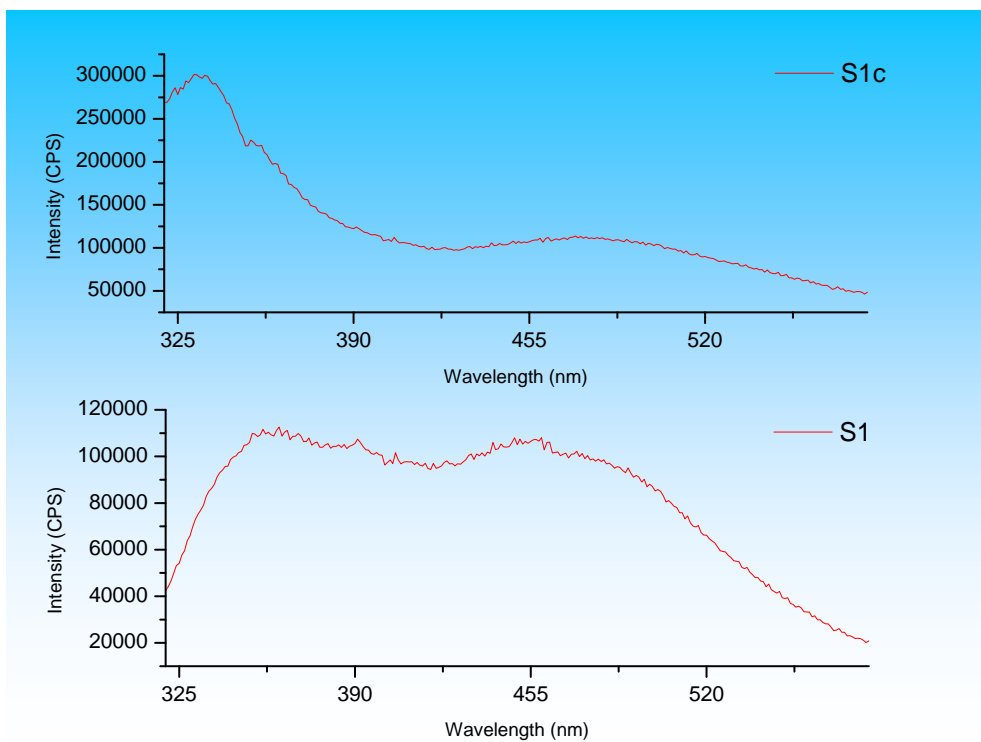
#### 1. Ex 332. Спектр возбуждения измерен на длине волны люминесценции 332 нм



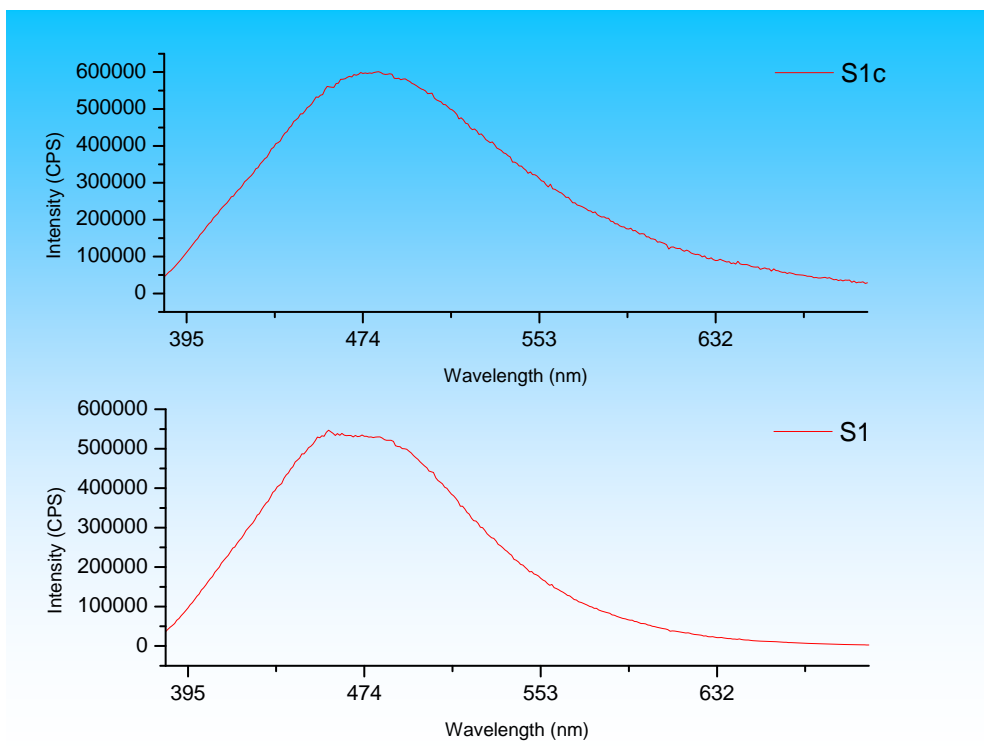
#### 2. Ex 475. Спектр возбуждения измерен на длине волны люминесценции 475 нм



3. Em under 300. Спектр люминесценции измерен при длине волны возбуждения 300 нм



4. Em 375. Спектр люминесценции измерен при длине волны возбуждения 375 нм





## Приложение 5. Заявка на изобретение

Форма № 94 ИЗ, ПМ, ПО-2011

**Федеральная служба по интеллектуальной собственности**  
Федеральное государственное бюджетное учреждение

**«Федеральный институт промышленной собственности»**  
(ФИПС)

Бережковская наб., 30, корп. 1, Москва, Г-59, ГСП-5, 123995      Телефон (8-499) 240-60-15 Факс (8-495) 531-63-18

**УВЕДОМЛЕНИЕ О ПОСТУПЛЕНИИ ЗАЯВКИ**

09.10.2012	069304	2012143161
<i>Дата поступления</i>	<i>Входящий №</i>	<i>Регистрационный №</i>

<p>ДАТА ПОСТУПЛЕНИЯ оригиналов документов заявки <b>ПОЛУЧЕНО</b> - 9 ОКТ 2012 ФИПС ОТД № 17</p> <p><input type="checkbox"/> (86) <i>(регистрационный номер международной заявки и дата международной подачи, установленные получающим ведомством)</i></p> <p><input type="checkbox"/> (87) <i>(номер и дата международной публикации международной заявки)</i></p>	<p>(21) РЕГИСТРАЦИОННЫЙ №</p> <p>(85) ДАТА ПЕРЕВОДА международной заявки на национальную фазу</p> <p>АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ <i>(реальный почтовый адрес, или иной телекоммуникационный адрес)</i> 183010, г. Мурманск, ул. Спортивная, 13, ФГБОУВПО «Мурманский государственный технический университет», патентный кабинет</p> <p>Телефон: (8152)477132 Факс: E-mail: plyasunovala@mstu.edu.ru АДРЕС ДЛЯ СЕКРЕТНОЙ ПЕРЕПИСКИ <i>(используется при подаче заявки на секретные изобретения)</i></p>	<p>ВХОДЯЩИЙ №</p> <p>ОТД № 17 9 ОКТ 2012 2406015</p>
<p><b>ЗАЯВЛЕНИЕ</b> о выдаче патента Российской Федерации на изобретение</p>		<p>В Федеральную службу по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам Бережковская наб., 30, корп.1, Москва, Г-59, ГСП-5, 123995</p>
<p>(54) НАЗВАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ</p> <p><b>Способ получения ферментативного белкового гидролизата из отходов рыбообрабатывающей промышленности</b></p> <p>(71) ЗАЯВИТЕЛЬ <i>(Указывается полное имя или наименование (согласно учредительному документу), место жительства или место нахождения, включая название страны и полный почтовый адрес)</i> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Мурманский государственный технический университет» (ФГБОУВПО «МГТУ») Российская Федерация, 183010, г. Мурманск, ул. Спортивная, 13</p> <p>Указанное лицо является <input type="checkbox"/> государственным заказчиком    <input type="checkbox"/> муниципальным заказчиком, исполнитель работ _____ <i>(указать наименование)</i></p> <p><input type="checkbox"/> исполнителем работ по    <input type="checkbox"/> государственному    <input type="checkbox"/> муниципальному контракту, заказчик работ _____ <i>(указать наименование)</i></p> <p>Контракт от _____ № _____</p>		
<p>(74) ПРЕДСТАВИТЕЛЬ(И) ЗАЯВИТЕЛЯ Указанное(ие) ниже лицо(а) назначено(назначены) заявителем(заявителями) для ведения дел по получению патента от его(их) имени в Федеральной службе по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам</p> <p>Фамилия, имя, отчество (если оно имеется) Плясунова Людмила Александровна</p> <p>Адрес: 183010, г. Мурманск, ул. Спортивная, 13, ФГБОУВПО «МГТУ», патентный кабинет</p> <p>Срок представительства <i>(указывается в случае назначения иного представителя без представления доверенности)</i></p>		<p>ОГРН 1025100848651</p> <p>КОД страны по стандарту ВОНС СТ. 3 <i>(если он установлен)</i> RU</p> <p>Является <input type="checkbox"/> Патентным(и) поверенным(и) <input checked="" type="checkbox"/> Иным представителем Телефон (8152) 477132</p> <p>Факс:</p> <p>E-mail: plyasunovala@mstu.edu.ru</p> <p>Регистрационный (с) номер (в) патентного(их) поверенного(их)</p>

Количество листов	24	Фамилия лица, принявшего документы
Количество документов, подтверждающих уплату пошлины	1	Сергеева Н.Н.
Количество изображений	0	

g.541

26.11.2012

Федеральная служба по интеллектуальной  
собственности  
Федеральное государственное бюджетное  
учреждение

Форма № 91 ИЗ-2012  
910,371

**Ф**  
«Федеральный институт  
промышленной собственности»  
(ФИПС)

Бережковская наб., 30, корп. 1, Москва, Г-59, ГСП-5, 123995  
Телефон (8-499) 240-60-15. Факс (8-495) 531-63-18

ФГБОУВПО "Мурманский  
государственный технический  
университет", патентный отдел  
ул. Спортивная, 13  
г. Мурманск  
183010

На № 08.1/1253 от 01.10.2012

Наш № 2012143161/10(069304)

При переписке просим ссылаться на номер заявки и  
сообщить дату получения настоящей корреспонденции  
от

Ф И П С

13 НОЯ 2012

ОТДЕЛ 20

**УВЕДОМЛЕНИЕ**

о положительном результате формальной экспертизы

(21) Заявка № 2012143161/10(069304)

(85) Дата начала рассмотрения международной заявки (РСТ) на национальной фазе

(22) Дата подачи заявки 09.10.2012

Формальная экспертиза по данной заявке завершена.

Ваша просьба об установлении приоритета по дате, указанной в заявлении о выдаче патента на изобретение, будет рассмотрена в процессе экспертизы заявки по существу.

Экспертиза заявки по существу будет проведена при поступлении соответствующего ходатайства, которое может быть подано в течение трех лет со дня подачи заявки на изобретение (п. 1 ст. 1386 Гражданского кодекса Российской Федерации) (далее – Кодекс).

Дополнительные материалы (Ваш исх. № от ) в части, изменяющей сущность заявленного изобретения, при рассмотрении заявки во внимание не принимаются, но могут быть представлены заявителем в качестве самостоятельной заявки (п. 2 ст. 1384, п. 2 ст. 1381 Кодекса).

Формальная экспертиза проведена в отношении пункта(ов) формулы.

Ходатайство о проведении экспертизы заявки по существу поступило .

Результаты рассмотрения ходатайства будут сообщены Вам дополнительно.

Ходатайство представлено без документа, содержащего сведения о произведенной уплате соответствующей патентной пошлины.

Ходатайство о проведении информационного поиска (п. 4 ст. 1386 Кодекса) поступило .

Результаты рассмотрения ходатайства будут сообщены Вам дополнительно.

Ходатайство представлено без документа, содержащего сведения о произведенной уплате соответствующей патентной пошлины.

Ходатайство о предоставлении права  на освобождение от уплаты пошлины  на уплату пошлины в уменьшенном размере  удовлетворено  не удовлетворено.

Ходатайство о внесении изменений в документы заявки  удовлетворено  не удовлетворено.

Заявление заявителя – автора с обязательством заключить договор об отчуждении патента на изобретение  удовлетворено  не удовлетворено (п. 1 ст. 1366 Кодекса).

(см. на обороте)

01	ППД 09.10.2012	200124
----	----------------	--------



Информация о дальнейшем делопроизводстве - по телефону (8-499) 240-61-38  
При изменении адреса для переписки просим своевременно сообщать об этом

- Ходатайство о досрочной публикации сведений о заявке на изобретение поступившее
- будет учтено
- не может быть учтено, т.к. не представлен документ, содержащего сведения о произведенной уплате патентной пошлины в установленном размере.
- Просьба автора не упоминать его в качестве такового при публикации сведений  о заявке  о патенте
- будет учтена
- не может быть учтена.

#### ПОЯСНЕНИЯ И ДОВОДЫ ЭКСПЕРТИЗЫ

Для устранения недостатков в оформлении документов заявки Вам следует в двухмесячный срок со дня получения настоящего уведомления представить

- текст описания, формулу изобретения и реферат, напечатанные шрифтом черного цвета через 1,5 интервала с высотой заглавных букв не менее 2,1 мм в соответствии с требованиями п. 10.11(8) Регламента\*\*
- описание изобретения, формулу изобретения, реферат и чертежи на листах, имеющих поля в соответствии с требованиями п. 10.11(6) Регламента\*\*.

**Обращаем Ваше внимание на то, что:**

- запрашиваемые документы (заменяющие листы) необходимо представить в 2-х экземплярах в соответствии с требованиями п. 10.11(2) Регламента\*\*;
- информация о состоянии делопроизводства по заявкам на выдачу патента на изобретение, поданным после 01.01.2007, размещена на сайте Роспатента по адресам: «[www.rupto.ru](http://www.rupto.ru)», «[www.fips.ru](http://www.fips.ru)».

Заместитель заведующего отделом

формальной экспертизы заявок на изобретения



М.Е.Мельникова

И.В.Семёнова

8-495-531-65-63

\*Положение о патентных и иных пошлинах за совершение юридически значимых действий, связанных с патентом на изобретение, полезную модель, промышленный образец, с государственной регистрацией товарного знака и знака обслуживания, с государственной регистрацией и предоставлением исключительного права на наименование места происхождения товара, а также с государственной регистрацией перехода исключительных прав к другим лицам и договоров о распоряжении этими правами, утвержденное постановлением Правительства Российской Федерации от 10.12.2008 № 941 (Собрание законодательства Российской Федерации от 22 декабря 2008 г. №51) с изменениями, утвержденными постановлением Правительства Российской Федерации от 15.09.2011 № 781 (Собрание законодательства Российской Федерации от 26 сентября 2011 г., №39, ст. 5487).

\*\*Административный регламент исполнения Федеральной службой по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам государственной функции по организации приема заявок на изобретение и их рассмотрения, экспертизы и выдачи в установленном порядке патентов Российской Федерации на изобретение зарегистрирован Министерством юстиции Российской Федерации 20.02.2009, рег. № 13413 (Бюллетень нормативных актов федеральных органов исполнительной власти от 25.05.2009 № 21).

Заявка на изобретение №2012143161

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) RU<sup>(11)</sup>2012143161<sup>(13)</sup> A

(51) МПК  
 A23J1/00 (2006.01)  
 A23J3/00 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ  
 СОБСТВЕННОСТИ,  
 ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ  
 (12) ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

По данным на 10.05.2014 состоянии делопроизводства: Экспертиза по существу

(21), (22) Заявка: 2012143161/10, 09.10.2012

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 09.10.2012

(43) Дата публикации заявки: 20.04.2014

Адрес для переписки:

183010, г. Мурманск, ул. Спортивная, 13,  
 ФГБОУ ВПО "Мурманский государственный  
 технический университет", патентный отдел

(71) Заявитель(и):

Федеральное государственное бюджетное  
 образовательное учреждение высшего  
 профессионального образования  
 "Мурманский государственный  
 технический университет" (ФГБОУ ВПО  
 "МГТУ") (RU)

(72) Автор(ы):

Широнина Анастасия Юрьевна (RU),  
 Новиков Виталий Юрьевич (RU),  
 Деркач Светлана Ростиславовна (RU)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ФЕРМЕНТАТИВНОГО БЕЛКОВОГО ГИДРОЛИЗАТА ИЗ ОТХОДОВ  
 РЫБООБРАБАТЫВАЮЩЕЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

(57) Формула изобретения

Способ получения ферментативного белкового гидролизата из отходов рыбообработывающей промышленности, характеризующийся тем, что подготовленное измельченное сырье подвергают ферментативному гидролизу с использованием ферментного препарата гелатопанкреатина при температуре 45-55°C продолжительностью 3-6 ч, при этом введение ферментного препарата в сырье осуществляют порциями в количестве 1-6 г/кг сырья с интервалом 10-30 мин в течение 3 ч с начала гидролиза.

**Приложение 6.** Акт об изготовлении опытной партии рыбного ферментативного белкового гидролизата.