

Научная статья

УДК 664.957.8

DOI 10.46845/1997-3071-2023-71-84-101

Опыт получения пептидов с низкой молекулярной массой из различных видов вторичного рыбного сырья

**Елисей Александрович Баженов¹, Лариса Степановна Байдалинова²,
Владимир Владимирович Волков³, Томас Гримм⁴**

^{1,2,3}Калининградский государственный технический университет, Калининград,
Россия

⁴Биотехнологическая компания ANiMOX, Берлин, Германия

¹ya.elisey2013@yandex.ru,

²ls.baydalina@gmail.com

³vladimir.volkov@klgtu.ru

⁴t.grimm@animox.de

Аннотация. Пептиды относятся к числу важных биологически активных веществ. За последние десятилетия предприняты большие усилия ученых по разработке и получению коротких (низкомолекулярных) пептидов, которые проявляют более высокие фармакологические свойства, чем их прототипы. Источником природных пептидов с высокой биологической активностью может служить вторичное рыбное сырье – отходы, получающиеся при разделке рыбы. На рыбоперерабатывающих предприятиях Калининградской области скапливается большое количество рыбных коллагенсодержащих отходов. В статье описывается возможность получения низкомолекулярных пептидов из вторичного коллагенсодержащего рыбного сырья способами комбинированного гидролиза, сочетающими ферментативную и термическую обработку. Исследовано и использовано вторичное рыбное сырье – чешуя сардины, головы судака, хребты речного окуня и кожа лосося. Изучены процессы расщепления белка сырья под действием трех типов гидролиза в водной среде – ферментативно-термического, термическо-ферментативного и термическо-ферментативно-термического. В экспериментах использованы ферментный препарат микробиологического синтеза Alcalase® 2,4L от компании Novozymes (Дания) и экспериментальный ферментный препарат из пищеварительных органов леща, изготовленный на базе ООО «Биотех». Выявлено, что при комбинированных двух- и трехступенчатых способах гидролиза обеспечивается максимальный выход протеиновых гидролизатов с низкомолекулярными пептидами. Изучены молекулярные массы пептидов, их аминокислотный состав, установлена высокая биологическая ценность полученных протеиновых гидролизатов с низкомолекулярными пептидами. Определено наличие в гидролизатах всех незаменимых аминокислот, а также повышенное содержание пролина, глицина, аланина, глутаминовой и аспарагиновой кислот, которые необходимы для укрепления иммунитета, эргодинамики организма и работы опорно-двигательного аппарата человека.

© Баженов Е. А., Байдалинова Л. С., Волков В. В., Гримм Т., 2023

Ключевые слова: вторичное рыбное сырье, ферментативный и термический гидролиз, низкомолекулярные пептиды.

Финансирование: исследование выполнено в рамках реализации программ малых грантов Немецкого экологического фонда (DBU, Германия) в лаборатории Центра передовых технологий использования белков (ЦПТИБ) Калининградского государственного технического университета.

Для цитирования: Баженов Е. А., Байдалинова Л. С., Волков В. В., Гримм Т. Опыт получения пептидов с низкой молекулярной массой из различных видов вторичного рыбного сырья // Известия КГТУ. 2023. № 71. С. 84-101. DOI 10.46845/1997-3071-2023-71-84-101

Original article

Experiments in Obtaining Low Molecular Weight Peptides from Various Types of Fish By-products

Elisey A. Bazhenov¹, Larisa S. Baydalina², Vladimir V. Volkov³, Thomas Grimm⁴

^{1,2,3} Kaliningrad State Technical University, Kaliningrad, Russia

⁴ Biotech Company ANiMOX, Berlin, Germany

¹ ya.elisey2013@yandex.ru,

² ls.baydalina@gmail.com

³ vladimir.volkov@klgtu.ru

⁴ t.grimm@animox.de

Abstract. Peptides are among the important biologically active substances. In recent decades, great efforts have been made by scientists to develop and produce short (low molecular weight) peptides that exhibit higher pharmacological properties than their prototypes. The source of natural peptides with high biological activity can serve as secondary fish raw materials – waste obtained during fish cutting. A large amount of fish collagen-containing waste accumulates at the fish processing enterprises of the Kaliningrad region. The article describes the possibility of obtaining low-molecular-weight peptides from secondary collagen-containing fish raw materials by combined hydrolysis methods combining both enzymatic and thermal treatment. Secondary fish raw materials have been studied and used- sardine scales, walleye heads, river perch ridges and salmon skin. The processes of protein splitting of raw materials under the action of three types of hydrolysis in an aqueous medium – enzymatic-thermal, thermal-enzymatic and thermal-enzymatic-thermal have been studied. In the experiments, the enzyme preparation of microbiological synthesis Alcalase® 2,4 L from Novozymes, Denmark, and an experimental enzyme preparation from the digestive organs of bream, manufactured on the basis of Biotech LLC, have been used. It has been revealed that the combined two- and three-stage hydrolysis methods provide the maximum yield of protein hydrolysates with low molecular weight peptides. The molecular weights of peptides, amino acid composition have been studied and a high biological value of the obtained protein hydrolysates with low molecular weight peptides has been established. The presence of all essential amino acids in hydrolysates has been determined, as well as an increased content of proline, glycine, alanine, glutamic and aspartic acids, which are necessary to in-

crease immunity, ergodynamics of the body and the work of the human musculoskeletal system.

Keywords: secondary fish raw materials, enzymatic and thermal hydrolysis, low molecular weight peptides.

Funding: The research was carried out within the framework of the programs of small grants of the German Environmental Foundation (DBU) Germany on the territory of "KSTU" in the laboratory "Protein Center".

For citation: Bazhenov E. A., Baydalina L. S., Volkov V. V., Grimm T. Experience of obtaining peptides with low molecular weight from various types of secondary fish raw materials // *Izvestiya KGTU = KSTU News*. 2023;(71):84-101. (In Russ.). DOI 10.46845/1997-3071-2023-71-84-101

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время расширяются исследования по получению из различного вторичного сырья активных пептидных композиций, являющихся биорегуляторами и биостимуляторами [1–4]. Усилия исследователей направлены на разработку коротких пептидов, проявляющих высокие фармакологические свойства, пептидных последовательностей, имеющих биологическую активность и терапевтическое значение, устойчивых к биodeградации и обладающих улучшенной биодоступностью [2]. Короткие пептиды улучшают работу иммунной системы человека, усиливая или регулируя биологические процессы, выполняют различные пластические функции, оказывают влияние на анаболические, антиоксидантные и другие биологические процессы, что обуславливает их высокую эффективность в медицине.

Важным направлением исследований является изучение и извлечение биологически активных веществ и компонентов из вторичного сырья, включая рыбное [5]. В Калининградской области на рыбообрабатывающих предприятиях ежедневно образуется большое количество рыбных отходов (головы, чешуя, хребты, пищеварительные органы). Большую часть их составляют ценные, но труднорастворимые коллагеновые белки, которые традиционными методами перевести в растворимое, биологически активное состояние не удастся. Получение из коллагенового рыбного сырья растворимых пептидов является перспективной задачей исследований и обработки [6].

Рыбные пептиды содержат много незаменимых аминокислот, которые в организме человека не синтезируются и должны поступать с пищей [2, 3, 4, 7]. Пептидные биорегуляторы из различного сырья являются объектами детальных исследований для определения возможности их использования в пищевой промышленности и фармакологии [1, 8, 9].

Коллагены рыб отличаются от коллагенов теплокровных животных тем, что имеют меньше поперечных связей между макромолекулами. У коллагенов рыб другой набор аминокислот, в том числе большое количество аспарагиновой и глутаминовой кислот. За счет этого рыбные белковые и коллагеновые гидролизаты легкоусвояемые и биологически эффективные. Активные пептиды с молекулярной массой менее 10 кДа составляют в них до 90 % массы белка [2, 7].

Низкомолекулярные пептиды из вторичного рыбного сырья могут использоваться при производстве продуктов спортивного питания [10, 11], в фармацев-

тике [2, 3], кормопроизводстве [8], в составе кормов для молоди лососей и других рыб в аквабиотехнологии [12]. Перспективным представляется получение низкомолекулярных пептидов с использованием методов гидролиза, осуществляющих комбинированное воздействие на рыбное сырье [13].

В статье описываются результаты экспериментов по получению протеиновых гидролизатов с низкомолекулярными пептидами из коллагенсодержащего вторичного рыбного сырья способами, сочетающими ферментативную и термическую обработки.

Исследовались процессы расщепления коллагенсодержащих белков с целью получения протеиновых гидролизатов, содержащих пептиды с низкой молекулярной массой, при различных способах гидролиза в водной среде – ферментативно-термическом, термическо-ферментативном и термическо- ферментативно-термическом [14, 15]. Определены химический, аминокислотный состав, биологическая ценность протеиновых гидролизатов с низкомолекулярными пептидами, молекулярные массы компонентов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для экспериментов использовано вторичное рыбное сырье (чешуя сардины (*Clupea pilchardus*, Val.), головы судака (*Sander lucioperca*), хребты окуня речного (*Perca fluviatilis*) и кожа лосося (*Salmo salar*)), предоставленное рыбоперерабатывающими предприятиями ОАО «РосКон» и ООО «Апрельское» (Калининградская обл.). На головах судака и хребтах окуня имелись значительные прирезы мышечной ткани. Химический состав сырья определяли методами, включенными в ГОСТ 7636-85. Белок выражался как сырой протеин (N·6,25).

При экспериментах сырье после измельчения на волчке с диаметром отверстий решетки 5 мм смешивали с водой в соотношении 1:1, дополнительно гомогенизировали миксером и подвергали гидролизу. Использовали три комбинированных способа гидролиза: ферментативно-термический (ФТ), термическо-ферментативный (ТФ) и термическо-ферментативно-термический (ТФТ) (табл. 1).

Таблица 1. Комбинированные способы гидролиза, использованные для получения протеиновых гидролизатов

Table 1. Combined methods for producing protein hydrolysates

Номера проб	Используемое сырье	Параметры технологического процесса
1*	Чешуя сардины	ФТ – ферментативный гидролиз при 50 °С (6 ч) и термический гидролиз при 130 °С (30 мин)
2*	Чешуя сардины	ТФ – термический гидролиз при 130 °С (1) ч и ферментативный гидролиз при 50 °С (6 ч)
3*	Чешуя сардины	ТФТ – термический гидролиз при 130 °С (1 ч), ферментативный гидролиз при 50 °С (4 ч) и термический гидролиз при 130 °С (30 мин)
4*	Головы судака	ФТ – ферментативный гидролиз при 50 °С (6 ч) и термический гидролиз при 130 °С (40 мин)

5*	Головы судака	ФТ – ферментативный гидролиз при 50 °С (6 ч) и термический гидролиз при 130 °С (30 мин)
5(1)**	Головы судака	ФТ – ферментативный гидролиз (с применением ферментного препарата из пищеварительных органов леща) при 50 °С (3 ч) и термический гидролиз при 130 °С (30 мин)
6*	Головы судака	ТФТ – термический гидролиз при 130 °С (1 ч), ферментативный гидролиз при 50 °С (4 ч) и термический гидролиз при 130 °С (30 мин)
7*	Хребты окуня	ФТ – ферментативный гидролиз при 50 °С (6 ч) и термический гидролиз при 130 °С (30 мин)
8*	Кожа лосося соленая	ФТ – ферментативный гидролиз при 50 °С (3 ч) и термический гидролиз при 130 °С (30 мин)
8(1)**	Кожа лосося соленая	ФТ – ферментативный гидролиз (с применением ферментного препарата из пищеварительных органов леща) при 50 °С (3 ч) и термический гидролиз при 130 °С (30 мин)

Обозначения: *при ферментативном гидролизе использован фермент Alcalase® 2,4 L; **при ферментативном гидролизе использован ферментный препарат из пищеварительных органов леща

Для осуществления ферментативной части гидролиза (Ф-гидролиза) к подготовленному материалу добавляли ферментный бактериальный препарат Alcalase® 2,4 L (Novozymes, Дания) или ферментный препарат из пищеварительных органов леща (изготовлен в ООО «Биотех»). Ферментативный гидролиз при температуре 50 °С с препаратом Alcalase® 2,4 L продолжался 6 ч, с ферментным препаратом из пищеварительных органов леща – 3 ч. Дозировка препарата Alcalase® 2,4 L составляла 0,5 % к массе сырья, а препарата из пищеварительных органов леща – 5 %.

Термические стадии гидролиза проводили в автоклаве аппарата РТ-5 (Россия), где пробы выдерживали при температуре 130 °С, давлении 0,25 МПа в течение 30, 40 и 60 мин при перемешивании.

При термическо-ферментативном процессе ферментные препараты вносили после завершения термической стадии и охлаждения смеси до 50 °С.

По завершении процессов гидролиза смеси разделяли центрифугированием при скорости вращения ротора центрифуги 3500 об./мин на три фракции: жировую (верхний слой), протеиновую (водно-белковую, средний слой) и минерально-протеиновую (осадочную, нижний слой). Жировую фракцию отделяли от водно-белковой после отстаивания в делительной воронке. Водорастворимые фракции (протеиновые гидролизаты) высушивали на лабораторной установке сублимационной сушки CHRIST Alpha 1-2 LDplus (Германия) с температурой в конденсоре минус 60 °С и температурой сублимации и сушки от минус 25 до 35 °С.

Фракционный состав протеинов в гидролизатах исследовали методом гельпроникающей хроматографии на аппаратуре Phenomenex (Yarra 3uSEC-2000, США). Сущность метода заключается в разделении протеиновой пробы колоночной гельпроникающей хроматографией (носитель Sephadex G 75 Superfine) и идентификации молекулярных масс фракций ультрафиолетовым детектором

UV-Detektor при длине волны 214 нм. Фиксировали время выхода при элюировании молекул с различными молекулярными массами и с использованием молекулярного стандарта (протеинов с известными молекулярными массами) рассчитывали молекулярные массы протеиновых фракций.

Аминокислотный (АК) состав сублимированных протеиновых гидролизатов определяли в лаборатории Атлантического филиала ВНИРО («АтлантНИРО») методом капиллярного электрофореза с использованием системы КЭ «КАПЕЛЬ®-105М» ГК «ЛЮМЭКС», Россия.

Сбалансированность АК-состава определяли по показателям «аминокислотный скор» (АКС) относительно «идеального» белка и «коэффициент различия аминокислотных скоров» (КРАС) [6]. Для оценки биологической ценности белков рассчитывали показатели их аминокислотной сбалансированности.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Общий химический состав вторичного рыбного сырья – чешуи сардины, голов судака, хребтов речного окуня и кожи лосося (соленой) – представлен в табл. 2.

Таблица 2. Общий химический состав вторичного рыбного сырья
Table 2. Total chemical composition of secondary fish raw materials

Сырье	Содержание, г/100 г			
	влаги	жира	белка (сырого протеина, N·6,25)	минеральных веществ (зола)
Чешуя сардины	63,8±0,3	0,4±0,1	16,7±0,6	19,1±0,4
Головы судака	67,8±0,6	1,6±0,1	21,4±0,5	9,2±0,5
Хребты окуня	79,0±0,5	0,9±0,1	18,5±0,5	1,6±0,5
Кожа лосося (соленая)	56,0±0,3	23,2±0,6	15,2±0,3	5,6±0,3

Как видим, наибольшее количество сухих веществ находится в чешуе сардины и коже лосося (соленой). Высокое содержание белка определено в головах судака и хребтах окуня, на которых имелись прирезы мышечной ткани. В коже лосося (соленой) много жира (23,2±0,6 %).

Выходы жировой, сублимированных протеиновой и минерально-протеиновой фракций при гидролизе тремя различными способами оценивались в процентах по отношению к содержанию сухих веществ в сырье (табл. 3).

Данные, представленные в табл. 3, показывают, что гидролиз ФТ с использованием фермента Alcalase® 2,4 L дает максимальные выходы протеиновой фракции из голов судака (проба 5) по сравнению с другим сырьем. Увеличение продолжительности термической обработки до 40 мин при pH 9,5 жидкой среды (проба 4) не обеспечило повышения выхода протеиновой фракции. Наибольший выход протеиновой фракции получается при обработке чешуи сардины при ТФТ-гидролизе. Выход протеинов из кожи лосося при ФТ-гидролизе составил более 80 % от сухих веществ сырья.

Таблица 3. Выход протеиновой, жировой и минерально-протеиновой фракций при комбинированных гидролизах вторичного рыбного сырья

Table 3. The yield of protein, fat and mineral- protein fractions from secondary fish

Номера проб	Сырье	Тип гидролиза	Выход сухих фракций, % от сухих веществ сырья		
			протеиновой	жировой	минерально-протеиновой
1	Чешуя сардины	ФТ*	12,2	–	8,2
2	Чешуя сардины	ТФ*	14,9	–	9,1
3	Чешуя сардины	ТФТ*	15,6	–	5,1
4	Головы судака	ФТ* при pH 9,5	10,2	1,8	10,3
5	Головы судака	ФТ*	22,8	2,5	3,5
5(1)	Головы судака	ФТ **	21,6	2,0	5,2
6	Головы судака	ТФТ*	12,5	1,7	12,1
7	Хребты окуня	ФТ*	18,5	1,9	8,8
8	Кожа лосося (соленая)	ФТ*	82,3	14,1	4,0
8(1)	Кожа лосося (соленая)	ФТ**	84,2	13,2	3,1

Обозначения: *при ферментативном гидролизе использован фермент Alcalase® 2,4 L; **при ферментативном гидролизе использован ферментный препарат из пищеварительных органов леща

Хорошие результаты при ФТ-гидролизе вторичного рыбного сырья показал ферментный препарат из пищеварительных органов леща. Так, в пробе 5(1) выход гидролизата всего на 5,3 % ниже по сравнению с пробой, полученной с ферментом Alcalase® 2,4 L (проба 5), а при ФТ-обработке кожи лосося с ферментом из пищеварительных органов леща (проба 8(1)) выход протеиновой фракции даже на 2,3 % выше по сравнению с пробой с Alcalase® 2,4 L (проба 8).

Важной характеристикой сухих гидролизатов является растворимость. Содержание в сублимированных гидролизатах сухих веществ, протеинов, растворимость протеинов в воде представлены в табл. 4.

Таблица 4. Содержание сухих веществ, протеинов и растворимость в воде сухих протеиновых гидролизатов, полученных из чешуи сардины, голов судака, хребтов окуня и кожи лосося

Table 4. Dry matter content, proteins and solubility in water of dry protein hydrolysates obtained from sardine scales, zander heads, perch spines and salmon skin

Номера образцов	Содержание сухих веществ (г/100 г)	Содержание золы (г/100 г)	Белок (сырой протеин, N° 6,25)			Растворимость протеинов, %
			Общий (г/100 г)	% от сухих веществ	растворимый (г/100 г)	
1*	91,13	1,60	79,50	87,23	79,42	99,9
2*	89,95	4,74	75,66	84,11	75,54	99,85
3**	94,33	1,97	82,00	86,92	81,75	99,7
4	93,53	3,68	79,78	85,30	79,31	99,42
5*	92,72	5,83	77,15	83,20	74,63	96,74
5(1)**	93,97	4,95	78,12	84,15	75,22	97,34
6*	92,38	4,09	78,46	84,93	78,33	99,84
7*	92,39	4,33	78,19	84,63	75,07	96,02
8	91,52	8,23	77,16	84,31	76,70	99,40
8(1)**	92,43	9,21	78,02	85,03	77,54	99,89

Обозначения: *при ферментативном гидролизе использован фермент Alcalase® 2,4 L; **при ферментативном гидролизе использован ферментный препарат из пищеварительных органов леща

По результатам, представленным в табл. 4, можно заключить, что все сухие гидролизаты содержат значительное количество протеинов – 75,66–82,00 % , что составляет 83,20–87,23 % от количества их сухих веществ. Все образцы хорошо растворимы в воде (растворимость не ниже 96,02 %).

Для оценки биологической ценности протеиновых гидролизатов исследовался их аминокислотный состав. Известно, что коллагеновый белок характеризуется высоким содержанием глицина и низким содержанием цистеина и триптофана. Содержание остатков пролина и гидроксипролина может превышать 20 % массы белка [9]. В табл. 5 и 6 представлены аминокислотные (АК) составы сухих (сублимированных) протеиновых гидролизатов.

Таблица 5. Аминокислотный состав сухих протеиновых гидролизатов из чешуи сардины, голов судака, хребтов окуня и кожи лосося, мг/г белка

Table 5. Amino acid composition of dry protein hydrolysates from sardine scales, pike-perch heads, perch spines and salmon skin, mg/g protein

Аминокислоты (АК)	Обозначения аминокислот	Номера проб и способы гидролиза					
		1 (ФТ*)	3 (ТФТ*)	5 (ФТ*)	6 (ТФТ*)	7 (ФТ*)	8 (ФТ*)
Аргинин	Arg	70,06	75,36	54,31	53,70	44,12	71,52
Лизин	Lys	54,21	50,98	51,88	50,51	51,41	45,43
Тирозин	Tyr	15,09	13,17	20,74	18,75	13,42	13,93
Фенилаланин	Phe	25,53	24,76	28,39	26,91	26,60	21,36
Гистидин	His	14,71	14,14	14,00	15,94	13,81	14,46
Лейцин + Изолейцин	Leu Ile	52,58	50,00	69,47	73,65	68,81	46,78
Метионин	Met	26,29	27,80	22,29	23,60	19,31	20,69
Валин	Val	51,70	15,85	22,42	13,26	20,21	11,09
Пролин	Pro	114,8 4	111,95	52,88	67,47	42,33	84,77
Треонин	Thr	29,81	30,49	31,23	33,04	29,29	26,09
Серин	Ser	39,75	41,58	38,36	46,17	34,02	44,48
Аланин	Ala	105,5 5	103,78	60,66	74,49	54,61	72,47
Глицин	Gly	214,9 7	219,00	86,49	115,81	74,56	172,52
Цистин + цистеин	Cys·Cys	1,26	1,21	4,02	1,27	3,84	1,35
Аспарагино- вая кислота + аспарагин	Asp·Asn	70,44	78,78	78,03	84,44	68,17	72,47
Глутаминовая кислота +глутамин	Glu·Glu	105,5 3	128,66	107,3	123,63	91,06	97,75

Обозначения: *при ферментативном гидролизе использован фермент Alcalase® 2,4 L

Сухие протеиновые гидролизаты из коллагенсодержащего вторичного рыбного сырья, полученные при ФТ-, ТФ- и ТФТ-способах гидролиза, содержат все незаменимые аминокислоты (триптофан не показан, так как он разрушается при кислотном гидролизе в процессе подготовки проб к анализу). Из заменимых аминокислот преобладающими (в мг/г белка) являются глицин (74,56–219,00), аланин (54,61–108,50), глутаминовая кислота + глутамин (91,06–129,66) и пролин (42,33–114,84), что согласуется с литературными данными [2, 11]. Именно эти АК необходимы для активной физической деятельности человека, работы опорно-

двигательного аппарата. Наибольшее количество пролина, аланина и глицина содержится в протеиновых гидролизатах из чешуи сардины.

Следует отметить, что глицин-аланин-глициновая последовательность аминокислотных повторов, встречающаяся только в коллагене чешуи рыб, обеспечивает высокий антиоксидантный и антигипертензивный эффекты [2, 7, 10].

Биологическую ценность белков гидролизатов оценивали по аминокислотному скору (АКС, %) незаменимых аминокислот относительно «идеального» белка – стандартной шкалы ФАО/ВОЗ, а избыток незаменимых аминокислот – по коэффициенту различия аминокислотных скоров (КРАС, %), определяли также биологическую ценность (БЦ, %). Сбалансированность аминокислотного состава учитывали по коэффициенту R_c (доли единицы) [6]. Значения этих характеристик представлены в табл. 6.

Таблица 6. Скоры незаменимых аминокислот протеинов в гидролизатах из вторичного рыбного сырья – чешуи сардины, голов судака, хребтов окуня и кожи лосося, полученных комбинированными способами, в %

Table 6. Scores of essential amino acids of proteins in hydrolysates from secondary fish raw materials – sardine scales, walleye heads, perch ridges and salmon skin, obtained by combined methods, in %

Незаменимые аминокислоты	Содержание аминокислот в идеальном белке, мг/г	Аминокислотные скоры (АКС, %) незаменимых аминокислот, экспериментальные образцы и способы гидролиза					
		1 – чешуя сардины (ФТ*)	3 – чешуя сардины (ТФТ*)	5 – головы судака (ФТ*)	6 – головы судака (ТФТ*)	7 – хребты окуня (ФТ*)	8 – кожа лосося (ФТ*)
Лизин	55	98,78	92,7	94,3	91,8	93,5	93,9
Гистидин	15	98,33	94,30	93,3	106,3	92,1	96,7
Треонин	40	74,7	76,2	78,1	82,6	73,2	74,1
Цистин + метионин	35	75,3	79,4	63,7	67,4	55,2	67,2
Валин	50	103,62	31,7	44,8	35,7	40,4	25,2
Изолейцин + лейцин	110	47,90	45,4	63,2	55,8	63,2	48,3
Тирозин + фенилаланин	60	67,87	63,2	81,9	76,1	81,9	66,8
Коэффициенты различия аминокислотных скоров (КРАС), %		28,9	32,6	25,7	33,2	27,1	27,0

Биологическая ценность (БЦ), %	71,1	67,4	74,3	66,8	72,9	73,0
Коэффициенты рациональности аминокислотного состава R_c	0,59	0,52	0,65	0,50	0,63	0,63

Обозначения: *при ферментативном гидролизе использован фермент Alcalase® 2,4 L

Протеиновые смеси из вторичного рыбного сырья отличаются достаточным содержанием незаменимых аминокислот. Все образцы имеют высокие значения скоров для этих аминокислот (от 60 % до 99 %), однако скоры для изолейцина и лейцина не превышают 63,2 %. В протеинах из чешуи сардины больше незаменимых аминокислот по сравнению с протеинами, полученными из голов судака и хребтов окуня. Аминокислотные скоры протеиновых фракций из голов судака несколько ниже (за исключением сора гистидина в образце, полученном ТФТ-гидролизом), чем у гидролизатов, полученных из другого сырья.

Представленные в табл. 6 значения коэффициентов БЦ указывают на высокую биологическую ценность протеиновых гидролизатов (66,8–74,3 %). Однако для некоторых незаменимых аминокислот аминокислотные скоры были достаточно низкими (у валина скоры 25,2–44,8 %), что отражается в коэффициентах рациональности аминокислотного состава (0,50–0,65). Полученные данные указывают на необходимость добавления дополнительных источников незаменимых аминокислот (в частности, валина) при изготовлении пищевых композиций с использованием пептидсодержащих протеиновых гидролизатов для обеспечения сбалансированности питания.

Для решения главной задачи исследования – получения из вторичного рыбного сырья гидролизатов с низкомолекулярными пептидами – необходимо было оценить молекулярные массы продуктов из различного сырья при комбинированных способах гидролиза. Результаты оценок молекулярно-массового состава протеиновых гидролизатов представлены на рис. 1–7.

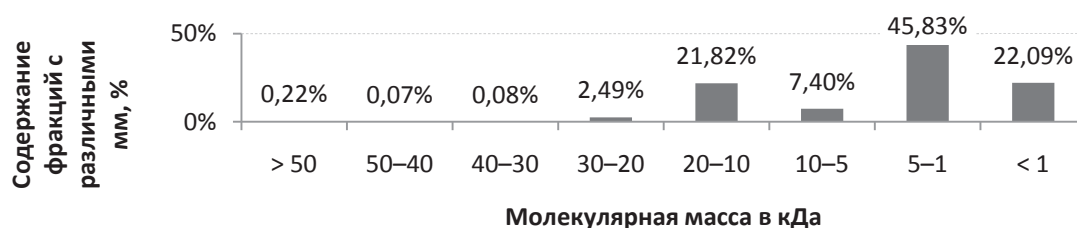


Рис. 1. Диаграмма молекулярных масс протеинового гидролизата пробы 2 (чешуя сардины), полученного методом ТФ-гидролиза, фермент Alcalase® 2,4 L

Fig. 1. Diagram of molecular weights of protein hydrolysate of sample 2 (sardine scales) obtained by TF-hydrolysis, enzyme Alcalase® 2,4 L

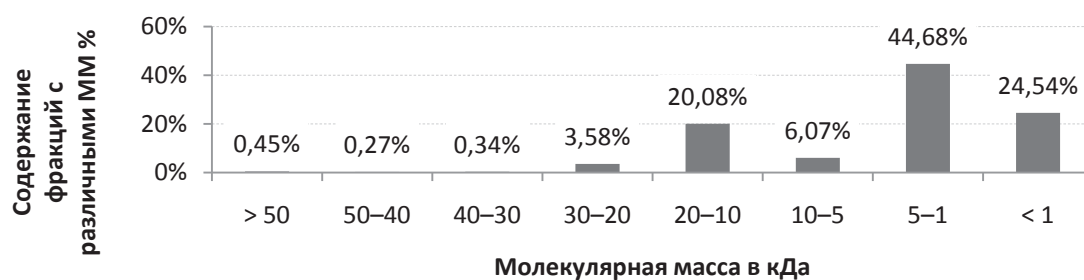


Рис. 2. Диаграмма молекулярных масс протеинового гидролизата пробы 3 (чешуя сардины), полученного методом ТФТ-гидролиза, фермент Alcalase® 2,4 L

Fig. 2. Diagram of molecular weights of protein hydrolysate in sample 3 (sardine scales) obtained by TFT-hydrolysis, enzyme Alcalase® 2,4 L

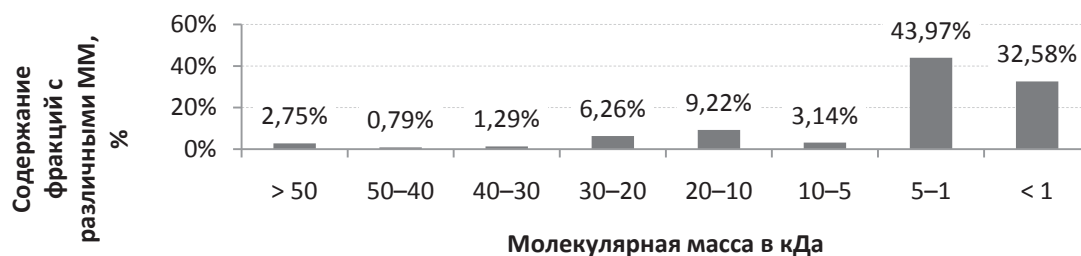


Рис. 3. Диаграмма молекулярных масс протеинового гидролизата пробы 5 (головы судака), полученного методом ФТ-гидролиза, фермент Alcalase® 2,4 L

Fig. 3. Diagram of molecular weights of protein hydrolysate in sample 5 (zander head) obtained by FT-hydrolysis, enzyme Alcalase® 2,4 L

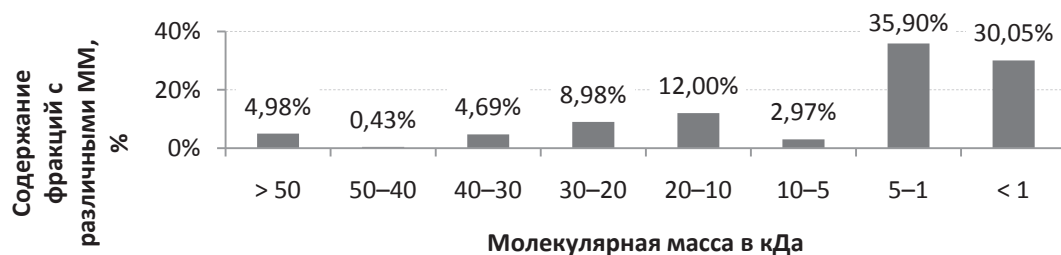


Рис. 4. Диаграмма молекулярных масс протеинового гидролизата пробы 5(1) (головы судака), полученного методом ФТ-гидролиза с использованием ферментного препарата из пищеварительных органов леща

Fig. 4. Diagram of molecular weights of protein hydrolysate in sample 5(1) (pikeperch heads) obtained by FT-hydrolysis obtained by FT hydrolysis using an enzyme preparation from the digestive organs of bream

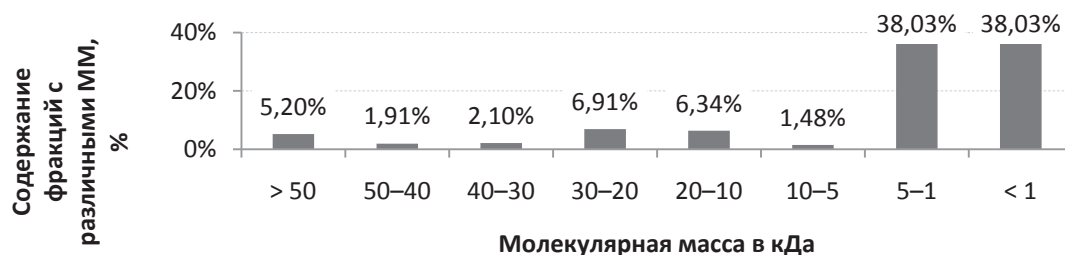


Рис. 5. Диаграмма молекулярных масс протеинового гидролизата пробы 7 (хребты окуня), полученного методом ФТ-гидролиза, фермент Alcalase® 2,4 L
Fig. 5. Diagram of molecular weights of protein hydrolysate in sample 7 (perch spines) obtained by FT-hydrolysis, enzyme Alcalase® 2,4 L

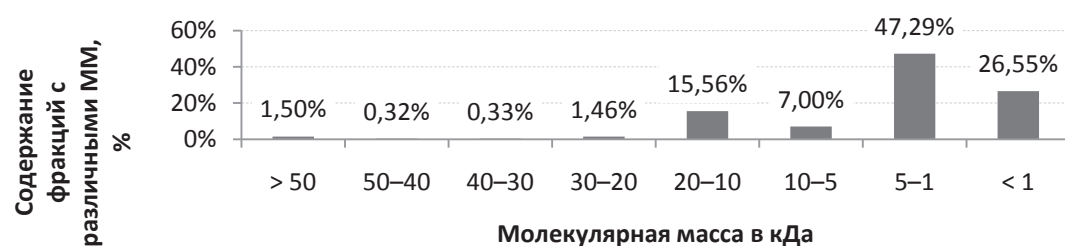


Рис. 6. Диаграмма молекулярных масс протеинового гидролизата пробы 8 (кожа лосося), полученного методом ФТ-гидролиза, фермент Alcalase® 2,4 L
Fig. 6. Diagram of molecular weights of protein hydrolysate in sample 8 (salmon skin), obtained by FT-hydrolysis, obtained by FT hydrolysis, enzyme Alcalase® 2,4 L

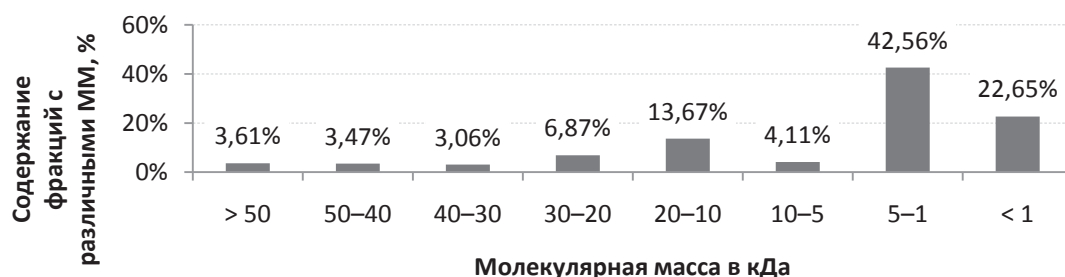


Рис. 7. Диаграмма молекулярных масс протеинового гидролизата пробы 8(1) (кожа лосося), полученного методом ФТ-гидролиза с использованием ферментного препарата из пищеварительных органов леща
Fig. 7. Diagram of molecular weights of protein hydrolysate in sample 8(1) (salmon skin) obtained by FT-hydrolysis, using an enzyme preparation from the digestive organs of bream

Результаты показывают, что у пептидов протеиновых гидролизатов из различного сырья молекулярно-массовое распределение различается в зависимости от вида используемого сырья и методов гидролиза. Но во всех образцах низкомолекулярные фракции (ММ менее 10 кДа) составляют от 75,29 до 80,84 % общей массы протеинов в гидролизате. Преобладают в этих фракциях пептиды с ММ

5–1 кДа, количество которых изменяется от 35,90 до 47,29 % от всех белков или от 49,04 до 61,39 % от масс фракций с ММ < 10 кДа.

На рис. 6 и 7 видно, что при ФТ-гидролизе кожи лосося соленой получается наибольшее количество пептидов с ММ 5–1 кДа (47,29 %). При ТФТ-гидролизе чешуи сардины (рис. 2) образуется меньшее количество пептидов (44,6 %) по сравнению с ФТ- и ТФ- способами. ФТ-гидролиз голов судака и хребтов окуня дает еще меньшие количества – 35–38 % (рис. 4, 5). При использовании фермента из пищеварительных органов леща (рис. 4) для обработки голов судака с примененной концентрацией выход пептидов с ММ 5–1 кДа и ММ < 1 кДа несколько ниже по сравнению с пробой, полученной с ферментом Alcalase® 2,4L.

Таким образом, эксперименты показали возможность получения протеиновых гидролизатов с активными низкомолекулярными пептидами из разнообразного по химическому составу и свойствам вторичного рыбного сырья – чешуи сардины, голов судака, хребтов речного окуня и кожи лосося. При испытанных способах гидролиза получают протеиновые гидролизаты с пептидными комплексами с ММ < 10 кДа, которые содержат все незаменимые аминокислоты и обладают высокой биологической ценностью. Для ферментативного гидролиза можно использовать бактериальный фермент Alcalase® 2,4 L и другие протеолитические ферменты, например, ферментные препараты из пищеварительных органов рыб.

ВЫВОДЫ

Изучены процессы расщепления белков вторичного рыбного сырья (чешуя сардины, головы судака, хребты речного окуня, кожа лосося) для получения протеиновых гидролизатов с низкой молекулярной массой пептидов при ферментативно-термическом, термическо-ферментативном и термическо-ферментативно-термическом способах гидролиза в водной среде.

Полученные результаты свидетельствуют о высоком биопотенциале коллагенсодержащего вторичного рыбного сырья и рациональности производства из него протеиновых гидролизатов. Испытанные способы гидролиза позволяют получать протеиновые гидролизаты с высокими концентрациями низкомолекулярных пептидов со сбалансированным аминокислотным составом.

Содержание фракций с ММ < 10 кДа составляет от 68,92 до 80,84 % общего количества протеинов гидролизатов. Во всех образцах во фракциях с ММ < 10 кДа преобладающими являются пептиды с ММ 5–1 кДа, составляющие в них от 49,04 до 61,39 %.

Протеиновые гидролизаты имеют сбалансированный аминокислотный состав, содержат все незаменимые и ценные заменимые аминокислоты с высокой биологической активностью, такие как пролин, глицин, аланин, глутаминовая и аспарагиновая кислоты. Выходы гидролизатов и их аминокислотный состав колеблются в зависимости от вида используемого сырья и способа гидролиза. Наиболее эффективными для получения протеиновых гидролизатов с увеличенным содержанием низкомолекулярных пептидов являются ТФТ- и ТФ-гидролизы.

Виды используемых ферментных препаратов также влияют на выходы и состав пептидных композиций. Использование для гидролиза сырья природного ферментного препарата из пищеварительных органов рыб (леща) позволяет получать низкомолекулярные пептиды, количество которых лишь несколько ниже по

сравнению с процессом, в котором используется ферментный препарат микробиологического синтеза Alcalase® 2,4 L.

Список источников

1. Морозов В. Г., Хавинсон В. Х. Пептидные биорегуляторы (25-летний опыт экспериментального и клинического изучения). Санкт-Петербург: Наука. 1996. 74 с.
2. Беседнова Н. Н., Эпштейн Л. М. Иммуноактивные пептиды из гидробионтов и наземных животных: монография. Владивосток: ТИНРО-центр. 2004. 248 с.
3. Kristinsson H. G., Rasco B. A. Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2000. V. 40. N. 1. P. 43–81. DOI: 10.1080/10408690091189266.
4. Vercruysse L., Van Camp J., Smagghe G. ACE inhibitory peptides derived from enzymatic hydrolysates of animal muscle protein: a review // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2005. V. 53 N. 21. P. 8106–8115. DOI: 10.12691/jfmr-1-6-5.
5. Мезенова О. Я. Перспективы получения и использования протеинов вторичного рыбного сырья // Вестник Международной академии холода. 2018. № 1. С. 5–10.
6. Воробьев В. И. Использование рыбного коллагена и продуктов его гидролиза // Известия КГТУ. 2008. № 13. С. 55–58.
7. Marine Proteins and Peptides. Biological activities and applications / edited by S. K. Kim. John Wiley and Sons. 2013. 785 p.
8. Биоактивные белки и пептиды: современное состояние и новые тенденции практического применения в пищевой промышленности и кормопроизводстве / Д. В. Гришин, О. В. Подобед, Ю. А. Гладилина, М. В. Покровская, Н. Н. Соколов // Вопросы онкологии. 2017. Т. 63. № 3. С. 497–505.
9. Антипова Л. В., Глотова И. А. Использование вторичного коллагенсодержащего сырья мясной промышленности. Санкт-Петербург: ГИОРД. 2006. 384 с.
10. Протеины из вторичного рыбного сырья как инновационные компоненты спортивного питания / А. Хелинг, Т. Гримм, В. В. Волков, Н. Ю. Мезенова // Известия КГТУ. 2015. № 39. С. 85–94.
11. Романенко Н. Ю., Мезенова О. Я., Некрасова Ю. О. Современные продукты спортивного питания // Вестник МГТУ. 2021. Т. 24. № 4. С. 414–427.
12. Оценка биопотенциала вторичного крабового сырья и продуктов его гидролиза для использования в аквабиотехнологии / О. Я. Мезенова, С. Н. Максимова, С. В. Агафонова, Н. Ю. Романенко, Н. С. Калинина, В. В. Волков, Й. Т. Мёрзель // Вестник МАХ. 2023. № 3. С. 44–52.

13. Исследования различных способов гидролитического процесса вторичного рыбного сырья консервного производства / А. Хелинг, Т. Гримм, В. В. Волков, Н. Ю. Мезенова // Вестник Международной академии холода. 2016. №. 1. С. 3–8. DOI: 10.21047/1606-4313-2016-16-1-3-8.
14. Сравнительная оценка способов гидролиза коллагенсодержащего сырья при получении пептидов и исследовании их аминокислотной сбалансированности / О. Я. Мезенова, В. В. Волков, Й. Т. Мёрзель, Т. Гримм, С. Кюн, А. Хелинг, Н. Ю. Мезенова // Известия ВУЗов. Прикладная химия и биотехнология. 2018. Т. 8. № 4. С. 83–94.
15. Способ получения пищевых добавок из вторичного рыбного сырья с применением гидролиза: пат. Рос. Федерация. № 2681352 С1 / Агафонова С. В., Байдалинова Л. С., Волков В. В., Городниченко Л. В., Гримм Т., Мезенова Н. Ю., Мезенова О. Я., Хелинг А.; заявл. 31.01.2018; опубл. 06.03.2019. Бюл. № 7.

References

1. Morozov V. G., Khavinson V. Kh. *Peptidnye bioregulatory (25-letniy opyt eksperimental'nogo i klinicheskogo izucheniya)* [Peptide bioregulators (25-year experience of experimental and clinical study)]. Saint-Petersburg, Nauka Publ., 1996, 74 p.
2. Besednova N. N., Epshtein L. M. *Immunoaktivnye peptidy iz gidrobiontov i nazemnykh zhivotnykh* [Immunoactive peptides from hydrobionts and terrestrial animals]. Vladivostok, TINRO-tsentr, 2004, 248 p.
3. Kristinsson H. G., Rasco B. A. Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2000, vol. 40, no. 1, pp. 43-81. DOI: 10.1080/10408690091189266.
4. Vercruysse L., Van Camp J., Smagghe G. ACE inhibitory peptides derived from enzymatic hydrolysates of animal muscle protein: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, vol. 53, no. 21, pp. 8106–8115. DOI: 10.1021/jf050165s.
5. Mezenova O. Ya. Perspektivy polucheniya i ispol'zovaniya proteinov vtorichnogo rybnogo syr'ya [Prospects of obtaining and using proteins of secondary fish raw materials]. *Vestnik Mezhdunarodnoy akademii kholoda*, 2018, no. 1, pp. 5–10.
6. Vorobyev V. I. Ispol'zovanie rybnogo kollagena i produktov ego gidroliza [Use of fish collagen and products of its hydrolysis]. *Izvestiya KGTU*, 2008, no. 13, pp. 55–58.
7. Marine Proteins and Peptides. Biological activities and applications. Ed.: by S. K. Kim. John Wiley and Sons. Moscow, 2013, 785 p.
8. Grishin D. V., Podobed O. V., Gladilina Yu. A., Pokrovskaya M. V., Sokolov N. N. Bioaktivnye belki i peptidy: sovremennoe sostoyanie i novye tendentsii prakticheskogo primeneniya v pishchevoy promyshlennosti i kormoproizvodstve [Bio-

active proteins and peptides: current state and new trends of practical application in the food industry and feed production]. *Voprosy onkologii*, 2017, vol. 63, no. 3, pp. 497–505.

9. Antipova L. V., Glotova I. A. *Ispol'zovanie vtorichnogo kollagensoderzhashchego syr'ya myasnoy promyshlennosti* [The use of secondary collagen-containing raw materials of the meat industry]. Saint-Petersburg, GIOR Publ., 2006, 384 p.

10. Heling A., Grimm T., Volkov V. V., Mezenova N. Yu. Proteiny iz vtorichnogo rybnogo syr'ya kak innovatsionnye komponenty sportivnogo pitaniya [Proteins from secondary fish raw materials as innovative components of sports nutrition]. *Izvestiya KGTU*, 2015, no. 39, pp. 85–94.

11. Romanenko N. Yu., Mezenova O. Ya., Nekrasova Yu. O. Sovremennye produkty sportivnogo pitaniya [Modern sports nutrition products]. *Vestnik MGTU*, 2021, vol. 24, no. 4, pp. 414–427.

12. Mezenova O. Ya., Maksimova S. N., Agafonova S. V., Romanenko N. Yu., Kalinina N. S., Volkov V. V., Merzel Y. T. Otsenka biopotentsiala vtorichnogo krabovogo syr'ya i produktov ego gidroliza dlya ispol'zovaniya v akvabiotekhnologii [Assessment of the biopotential of secondary crab raw materials and products of its hydrolysis for use in aquabiotechnology]. *Vestnik MAKH*, 2023, no. 3, pp. 44–52.

13. Heling A., Grimm T., Volkov V. V., Mezenova N. Yu. Issledovaniya razlichnykh sposobov gidroliticheskogo protsessa vtorichnogo rybnogo syr'ya konservnogo proizvodstva [Studies of various methods of hydrolytic process of secondary fish raw materials of canning production]. *Vestnik Mezhdunarodnoy akademii kholoda*, 2016, no. 1, pp. 3–8. DOI: 10.21047/1606-4313-2016-16-1-3-8.

14. Mezenova O. Ya., Volkov V. V., Merzel T., Grimm T., Kuhn. S., Heling A., Mezenova N. Yu. Sravnitel'naya otsenka sposobov gidroliza kollagensoderzhashchego syr'ya pri poluchenii peptidov i issledovanii ikh aminokislotnoy sbalansirovannosti [Comparative evaluation of the methods of hydrolysis of collagen-containing raw materials in the production of peptides and the study of their amino acid balance]. *Izvestiya VUZov, Prikladnaya khimiya i biotekhnologiya*, 2018, vol. 8, no. 4, pp. 83–94.

15. Agafonova S. V., Baydalina L. S., Volkov V. V., Gorodnichenko L. V., Grimm T., Mezenova N. Yu., Mezenova O. Ya., Heling A. Sposob polucheniya pishchevykh dobavok iz vtorichnogo rybnogo syr'ya s primeneniem gidroliza [Method of obtaining food additives from secondary fish raw materials using hydrolysis]. Patent RF, no. 2681352 C1, 2018.

Информация об авторах

Е. А. Баженов – аспирант 4 курса обучения

Л. С. Байдалинова – кандидат технических наук, доцент, старший научный сотрудник

В. В. Волков – генеральный директор ООО «Биотех»

Т. Гримм – управляющий директор технологической лаборатории, руководитель отдела исследований и разработок

Information about the authors

E. A. Bazhenov – 4th year postgraduate student

L. S. Baydalina – PhD in Engineering, Associate Professor, Senior Researcher

V.V. Volkov – General Director of Biotech LLC

T. Grimm - Managing Director of the Technology Laboratory, Head of the Research and Development Department

Статья поступила в редакцию 10.06.2023; одобрена после рецензирования 25.09.2023; принята к публикации 10.10.2023.

The article was submitted 10.06.2023; approved after reviewing 25.09.2023; accepted for publication 10.10.2023.