

Влияние способа сушки на свойства ферментного препарата из гепатопанкреаса камчатского краба *Paralithodes camtschaticus*

Рысакова К.С., Лыжов И.И., доктор биол. наук В.А. Мухин, канд. хим. наук В.Ю. Новиков – ПИНРО

Сфера практического применения гидролитических ферментных препаратов постоянно расширяется. Высокая активность этих ферментов в гепатопанкреасе камчатского краба вызывает постоянный интерес исследователей. Обнаружению, выделению и очистке протеиназ из этого органа посвящено значительное количество публикаций [1-6].

В связи с открытием промышленного лова камчатского краба *Paralithodes camtschaticus*, акклиматизированного в Баренцевом море, большую актуальность приобретает вопрос о рациональном использовании отходов, образующихся при производстве пищевой продукции из него. Гепатопанкреас краба является одним из таких побочных продуктов [7]. Процессы получения ферментных препаратов различной степени очистки подробно описаны в научно-технической литературе. Однако такой вопрос, как сушка готового препарата остается не освещенным, главным образом, потому что исследователи ограничиваются получением небольшого количества ферментов для аналитических целей. При промышленном выпуске ферментных препаратов, вопрос об их получении в виде сухого порошка, способного храниться длительное время, выходит на первый план.

В настоящей работе исследовано влияние различных способов сушки на свойства комплексного ферментного препарата из гепатопанкреаса камчатского краба.

Методика

В качестве объекта исследования использовали комплексный ферментный препарат протеолитического действия, полученный из гепатопанкреаса камчатского краба на экспериментально-производственном участке ПИНРО по следующей схеме (табл. 1).

Для центрифугирования использовали центрифугу AVANTI J-25 "BESCKMAN" (Швейцария).

Ультрафильтрацию проводили на колонках с полуволоконными мембранами НПО "Биоспектр" (Россия), рассчитанных на отделение белковых растворимых веществ с молекулярными массами (ММ) 5 и 100 кД.

Концентрированный раствор сушили до порошкообразного состояния. Для этого использовали сушилки трех типов: лиофильная сушилка (препарат А); распылительная сушилка (препарат Б) и вакуум-сушильный шкаф (препарат В).

В полученных препаратах определяли протеолитическую активность, а также общий химический состав и фракционный состав белков.

Протеолитическую активность определяли по расщеплению гемоглобина и казеината натрия. Для этого использовали 1 %-ные растворы указанных белков [8].

Активность ферментов выражали в единицах изменения оптической плотности растворов, содержащих продукты гидролиза субстратов при 37 °С, pH 7,5 за 1 час инкубации. Оптическую плотность растворов измеряли спектрофотометрически при 280 нм.

При сравнении протеолитической активности препаратов за 100 % принимали активность препарата, высушенного в лиофильной сушилке.

Определение массовой доли воды, остатка после прокаливания (зола), общих липидов и азота проводили общепринятыми методами [9].

Для определения фракционного состава белков использовали метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). ВЭЖХ (SEC HPLC) проводили с использованием прибора Shimadzu LC-10A_{vp} (Япония) и колонки (30 x 0,78 см) TSK-gel Alpha-4000, а также предколонки TSK-guardcolumn Alpha (6 x 0,4 см) для эксклюзион-

ной хроматографии фирмы «TOSOH» (Япония). Эта колонка позволяет делить в своем рабочем объеме (линейный участок калибровочной кривой) белковые соединения с ММ от 10 до 1500 кД.

Результаты и их обсуждение

На первом этапе исследований, нами был изучен фракционный состав белков в полученном препарате до сушки и определена протеолитическая активность в каждой фракции.

При разделении исследуемого препарата на колонке TSK-геля методом SEC HPLC обнаруживается семь основных белковых фракций (рис. 1).

Основная протеолитическая активность, в том числе и удельная (отнесенная к количеству белка) связана с четвертой фракцией белков (ММ от 63,0-31,0 кД) (табл. 2). Значительную активность обнаруживают и «соседние» – третья и пятая фракции. Большинство выделенных исследователями хроматографически чистых протеолитических ферментов из этого источника имеют ММ в диапазоне 24-66 кД [6, 10-16].

В то же время, Г.Н. Руденской с сотрудниками описана аминокатализирующая РС из гепатопанкреаса камчатского краба, имеющая ММ 220 кД [17].

Протеолитическая активность у высокомолекулярных (I фракция) и низкомолекулярных белков (VI-VII фракции) обнаруживается, из-за недостаточно четкого хроматографического разделения белковых компонентов. Кроме того, метод гель-фильтрации не идеален для определения ММ и мы не можем утверждать, что используемый нами TSK-гель является абсолютно инертным носителем, не обладающим «удерживающей» способностью по отношению ко всем белковым соединениям. Таким образом, нет гарантии, что, например, в VI фракцию с ММ, равной по калибровочной кривой 2,6-0,5 кД, не попали некоторые белки со значительно большей ММ.

Несмотря на то, что общий химический состав ферментных препаратов, высушенных различными способами, практически одинаков, фракционный состав водорастворимых белков значительно варьирует (табл. 3).

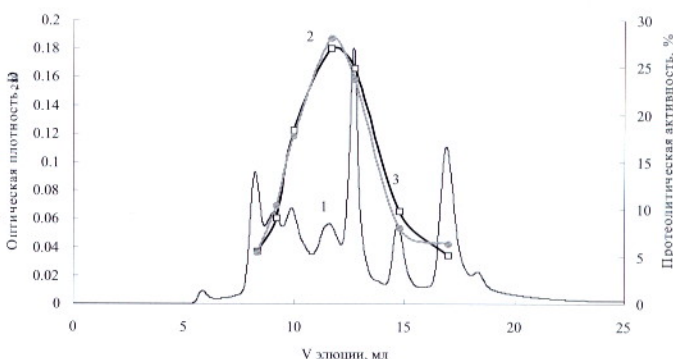


Рис. 1. Профиль элюции белков (1); протеолитическая активность по отношению к 1 %-ному раствору гемоглобина (2) и 1 %-ному раствору казеината натрия (3) препарата протеиназ из гепатопанкреаса камчатского краба. Нанесено 100 мкл 1 %-ного раствора ферментного препарата. Колонка (30 x 0,78 см) TSK-геля Alpha-4000, предколонка TSK-guardcolumn Alpha (6 x 0,4 см). Скорость элюции 1 мл/мин.

Таблица 1

Схема выделения и очистки комплекса протеиназ из гепатопанкреаса камчатского краба

Процесс	Цель	Условия
1. Гомогенизация	Разрушение клеточных мембран	3-х кратное замораживание (минус 20 °С) - оттаивание (5 °С) и механическое измельчение на гомогенизаторе 1094 "TECATOR" (Швеция)
2. Экстракция	Растворение основного количества белков	0,1-0,5 М раствор NaCl
3. Центрифугирование	Отделение нерастворимых белковых компонентов (осадок) и липидов (верхняя пленка)	10 тыс. об/мин x 20 мин. при +4 °С
4. Ультрафильтрация (концентрирование и промывание)	Отделение низкомолекулярных неактивных по отношению к белку белковых фракций, уменьшение общего объема (до 1 л), отделение солей и других низкомолекулярных соединений	Половолоконные мембраны отделяющие >100 кД и <5 кД. Промывание 5 объемами экстрагирующего раствора и 5 объемами дистиллированной воды.

Таблица 2

Распределение содержания белковых веществ и протеолитической активности по HPLC-фракциям препарата протеиназ

№ фракции	ММ, кД по калибровке	из гепатопанкреаса камчатского краба			Удельная протеолитическая активность, у. е.
		содержания от всех белков	протеолитической активности по отношению к:		
			1 %-ному гемоглобину	1 %-ному казеинату натрия	
I	800,0-352,6	12,92	5,42	5,61	0,427
II	352,6-162,6	9,97	10,40	9,18	0,982
III	162,6-63,0	13,08	17,79	18,37	1,382
IV	63,0-31,0	12,17	28,13	27,00	2,265
V	31,0-2,6	22,52	23,79	24,92	1,081
VI	2,6-0,5	9,55	8,08	9,80	0,936
VII	менее 0,5	19,8	6,39	5,12	0,290

Очевидно, что способ сушки оказывает существенное влияние на свойства белков, входящих в состав комплексного ферментного препарата.

В процессе сушки, часть белковых соединений теряет нативную структуру (денатурируется), в результате чего общее содержание водорастворимых фракций снижается.

Наибольшее количество белков сохраняет свою природную структуру в процессе лиофильной сушки. Действительно, в ходе лиофилизации, белки не подвергаются тепловому воздействию и не денатурируются. Следовательно, этот вид сушки в «щадящих» условиях обеспечивает наиболее полное сохранение ферментативной активности.

В процессе распылительной сушки препарата, как и следовало ожидать, теряется ряд нативных свойств, так как концентрированный раствор белков подвергается кратковременному высокотемпературному воздействию (60-80 °С), что выше температуры денатурации большинства белков, в результате – ферментативная активность существенно снижается.

Наименее пригодным способом сушки, с точки зрения получения ферментов с нативными свойствами, является сушка в вакуум-сушильном шкафу. Очевидно, в ходе сушки при комнатной температуре значительная часть гидролаз расщепляется под воздействием автолиза, о чем косвенно свидетельствует снижение содержания высокомолекулярных белковых фракций, в том числе и фракций, обеспечивающих протеолитическую активность (табл. 3).

До сих пор мы обсуждали влияние различных способов сушки на качество получаемых ферментных препаратов, однако, с точки зрения технологической рентабельности получения препарата в промышленных условиях, большую роль играет такой показатель как себестоимость процесса. С этой позиции три приведенных способа сушки препарата по эффективности выстраиваются в обратном порядке.

Наиболее рентабельной, как по используемому оборудованию, так и по выходу ферментного препарата, является сушка препарата под вакуумом. При распылительной сушке происходит потеря некоторой части препарата (рассеивание), а оборудование стоит значительно дороже. Лиофильная сушка – наиболее длительный процесс, а промышленные лиофильные сушилки являются наиболее дорогими (табл. 4).

Следует отметить, что приведенное сравнение справедливо для марок сушилок, используемых в настоящем исследовании.

Таблица 3

Химический состав, фракционный состав белков и протеолитическая активность ферментных препаратов из гепатопанкреаса камчатского краба

Показатели	Препарат А	Препарат Б	Препарат В
Влага, %	7,11	6,86	8,12
Липиды, %	Следы	Следы	Следы
Зола, %	3,56	3,44	3,24
N общ., %	11,32	11,54	10,96
Всего водорастворимых белковых веществ (усл. ед.): из них с ММ (Кд)	100	71,21	62,36
800-162,6	16,33	9,04	9,54
162,6-63,0	15,41	7,66	8,46
63,0-31,0	40,82	33,71	20,63
31,0-2,6	27,44	20,81	23,73
Протеолитическая активность (усл. ед.), субстрат:			
1 % казеинат Na	0,856	0,643	0,544
1 % гемоглобин	0,908	0,793	0,748

Таблица 4

Сравнение различных способов сушки ферментного препарата из гепатопанкреаса камчатского краба

№	Способ сушки	Оборудование	Временные затраты на получение 1 кг препарата	Дополнительные сведения
1	Лиофильная	Лиофильная сушилка фирмы «Нето» FD-8 (Дания)	До 200 ч	
2	Распылительная	Распылительная сушилка фирмы «Invensys» APV – Anhydro A/S (США)	19,5 ч	Потери препарата до 15 %
3	Сушка под вакуумом	Вакуум-сушильный шкаф ШСВ – 45 к (Россия)	12 ч	

Таким образом, анализ свойств и активности ферментных препаратов из гепатопанкреаса камчатского краба, полученных с применением различных видов сушки, позволяет сделать следующие выводы:

1. Лиофильно высушенный препарат максимально сохраняет гидролитическую активность и нативный фракционный состав входящих в него белков;
2. Сушка в вакуум-сушильном шкафу является экономически наиболее рентабельной и производительной, что достигается, однако, в ущерб качеству препарата;
3. Выбор того или иного способа сушки, вероятно, должен определяться объемами и коммерческой стоимостью получаемого препарата.

Авторы выражают благодарность начальнику научно-экспериментального участка ПИНРО Кирееву Владимиру Викторовичу за предоставленные препараты протеиназ из гепатопанкреаса камчатского краба.

Литература

1. Сахаров И.Ю. Выделение и исследование ферментов из морских организмов и некоторые аспекты их применения: Автореф. диссертации доктора хим. наук. – М., 1992. – 47 с.
2. Литвин Ф.Е. Коллагенолитические протеазы из гепатопанкреаса камчатского краба: выделение и свойства: Автореф. диссертации канд. биол. наук. – М., 1993. – 20 с.
3. Руденская Г.Н., Купенко О.Г., Исаев В.А., Степанов В.М., Дунаевский Я.Е. // Биоорганическая химия. – 1995. – Т. 21, № 4. – С. 249-255.
4. Герасимова Н.А., Купина Н.М. // Прикладная биохимия и микробиология. – 1995. – Т. 32, № 4. – С. 411-415.
5. Руденская Г.Н., Исаев В.А., Калебина Т.С., Степанов В.М., Мальцев К.В., Швеи С.В., Лукьянова Н.А., Кислицын Ю.А., Мирошников А.И. // Биоорганическая химия. – 1998. – Т. 24, № 2. – С. 112-118.
6. Купина Н.М., Герасимова Н.А. // Прикладная биохимия и микробиология. – 1999. – Т. 35, № 3. – С. 303-307.]
7. Купина Н.М., Леваньков С.В. // Рыбное хозяйство. – 1998. – № 4. – С. 56-57.
8. Лисицын А. Б., Иванкин А. Н., Неклюдов А. Д. Методы практической биотехнологии. Анализ компонентов и микропримесей в мясных и других пищевых продуктах. – М.: ВНИИМП, 2001. – 408 с.
9. Методические указания по отбору, первичной обработке, хранению и анализу образцов при биогеохимических исследованиях морских экосистем. – М.: ВНИРО, 1981. – 27 с.
10. Galgani F., Nagayama F. // Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. – 1988. – Vol. 54, No. 6. – P. 983-987.
11. Chen Y.L., Lu P.J., Tsai I. // Comp. Biochem. Physiol. – 1991. – Vol. 100 B, No. 4. – P. 763-768.
12. Sacharov I.Yu., Dzunkovskaya A.V., Artyukov A.A., Zakharova N.N. // Comp. Biochem. Physiol. – 1993. – Vol. 106 B, No. 3. – P.681-684.
13. Руденская Г.Н., Купенко О.Г., Исаев В.А., Степанов В.М., Дунаевский Я.Е. // Биоорганическая химия. – 1995. – Т. 21, № 4. – С. 249-255.
14. Мухин В.А., Немова Н.Н., Крупнова М.Ю., Кяйвярайнен Е.И. // Прикладная биохимия и микробиология. – 1999. – Т. 35. – № 4. – С. 409-412.
15. Кислицын Ю.А., Ребриков Д.В., Руденская Д.Н. // Химия протеолитических ферментов: Тез. докл. V симпозиума, 22-24 апреля 2002 г. – Москва: ИБХ РАН, 2002. – С. 49.
16. Ребриков Д.В., Руденская Д.Н. // Химия протеолитических ферментов: Тез. докл. V симпозиума, 22-24 апреля 2002 г. – Москва: ИБХ РАН, 2002. – С. 50.
17. Руденская Г.Н., Шмойлов А.М., Исаев В.А., Ксенофонтов А.В., Швеи С.В. // Биохимия. – 2000. – Т. 65, Вып. 2. – С. 199-206.

Rysakova K.S., Lyzhov I.I., Mukhin V.A., Novikov V.Yu.

Influence of drying method on characteristics of enzyme preparation derived from hepatopancreas of king crab *Paralithodes camtschaticus*

Since commercial fishing of king crab in the Barents Sea opens, the problem arises of rational use of wastes being obtained during its processing. Crab hepatopancreas is characterized by enzymes of high efficiency. The authors study various procedures of hepatopancreas drying and characteristics of finished product (complex ferment preparation) derived from them.

ПО СООБЩЕНИЯМ СМИ

● Управление Генпрокуратуры в ДФО завершает комплексную проверку по исполнению законодательства в рыбной отрасли

На Дальнем Востоке самое большое количество преступлений в рыбной отрасли, а также преступлений, связанных с коррупцией чиновников в этой сфере, Об этом на пресс-конференции в Южно-Сахалинске сообщил заместитель генерального прокурора РФ Юрий Гулягин.

«Рыбодобывающая отрасль на Дальнем Востоке России остается высокочастотной и высокорепримированной», – заявил Гулягин. По его словам, в Приморском крае в настоящее время идет расследование по уголовному делу, по которому уже проходят 26 фигурантов, всего их предположительно будет 35 человек. Это, по его словам, организованная устойчивая группировка, которая в течение пяти лет занималась незаконной добычей и контрабандой краба в страны АТР. Причем в данную группировку входили не только рыбаки и руководители компаний, но и представители контролирующих структур. «Этот пример характерен для всей рыбной отрасли дальневосточного региона. Аналогичное дело сейчас расследует следственный комитет МВД в отношении такой же организованной группировки на Сахалине», – сказал Гулягин.

Управление Генпрокуратуры в ДФО сейчас завершает комплексную проверку по исполнению федерального законодательства в рыбной отрасли и лесопромышленном комплексе во всех субъектах округа. «Во всех регионах ДФО выявлено значительное количество нарушений федерального законодательства в рыбной и лесной отраслях. Эти нарушения однотипны для всех регионов», – отметил заместитель генпрокурора. Так, в Хабаровском крае возбуждено уголовное дело в отношении заместителя начальника УВД, который покрывал ряд фирм, занимающихся незаконной заготовкой леса и его контрабандой в Китай.

Особое нарекание Гулягина вызвала деятельность филиалов РФФИ. «РФФИ у нас на особом контроле в силу разных скандалов вокруг филиалов этой организации», – заявил он. Так, в Приморском крае выявлен факт, когда филиал РФФИ реализовал рыбопродукцию по бросовым ценам, рекомендованным оценщиками. «Стоимость некоторых видов рыбопродукции доходила до 42 копеек за 1 кг», – отметил Юрий Гулягин. Причем такую низкую стоимость продукции оценщики объясняли тем, что «якобы данная рыбопродукция, реализуемая РФФИ, может оказаться невостребованной, так как она была конфискована». «Но оценщик дает оценку, которая носит рекомендательный характер, окончательное решение должен принимать филиал РФФИ. Но филиал почему-то согласился с такой оценкой», – отметил заместитель генпрокурора. По данному факту будет возбуждено уголовное дело. Аналогичные нарушения выявлены на Сахалине и Камчатке.

Expert.ru