

Интенсивность гидролиза белков черноморского шпрота ферментным препаратом протосубтилин Г3Х

А. ВИННОВ, канд. техн. наук
 Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины

Анотація. Розглянуто питання можливості інтенсифікації ферментного гідролізу білків чорноморського шпроту регулюванням режиму руху фермент-субстратної маси. Визначено характер реологічної поведінки фаршу чорноморського шпроту, встановлено межі режимів руху сировинної маси. Встановлено, що при ламінарному та перехідному режимі швидкість руху ферментативного гідролізу може бути збільшена в 1,3-1,47 рази.

Ключові слова: білковий гідролізат, протосубтилін Г3Х, псевдопластичне тіло, режим руху, тривалість гідролізу, швидкість гідролізу.

Abstract. Black Sea sprat proteins enzymatic hydrolysis intensifying possibility by enzyme - substrate mass motion mode regulating is investigated. Minced Black Sea sprat rheological behavior character is determined defined borders driving modes raw mass. It was found that the laminar and transitional modes of movement are able to accelerate the enzymatic hydrolysis velocity in 1, 3 - 1,47 times.

Key words: protein hydrolyzat, protosubtilin G3X, pseudoplastic body, motion mode, the duration of the hydrolysis, hydrolysis velocity.

Рациональное использование рыбного сырья и водных беспозвоночных связано с созданием научно обоснованных комплексных малоотходных технологий их глубокой переработки. Одной из таких технологий является производство ферментативных белковых гидролизатов. В настоящее время эти продукты находят все более широкое применение в пищевой, медицинской, комбикормовой и микробиологической промышленности, косметологии. [1, 2]

Основной проблемой технологии ферментативных белковых гидролизатов является длительность процесса, что создает условия для развития гнилостной микрофлоры. В этой связи, разработка способов интенсификации процесса ферментативного гидролиза высокомолекулярных белковых веществ рыбного сырья является актуальным и практически значимым [3].

В промышленных условиях при производстве

рыбных ферментативных белковых гидролизатов в процессе формирования фермент - субстратных систем, образуется сложная по химическому составу и коллоидному состоянию смесь. Она состоит из раствора ферментного препарата, растворенных, эмульгированных и диспергированных компонентов сырья, при этом основная часть белкового субстрата входит в состав диспергированных фрагментов измельченных тканей рыбы. В этих условиях закономерности ферментативного гидролиза определяются не только свойствами ферментов и субстратов (специфичность, значение pH, термолабильность, наличие эффекторов и др.), но и комплексом макрокинетических процессов.

Для взаимодействия активного центра фермента и субстрата необходимо их сближение на расстояние порядка 15 - 20 ангстрем [8]. Для достижения необходимого позиционирования в реаль-

ных системах, фермент и субстратный фрагмент (фрагмент измельченной ткани сырья) должны быть приближены друг к другу. Затем растворенный фермент должен переместиться через неподвижный слой жидкости на поверхности субстратного фрагмента (диффузионный слой Нернста) и только после этого он может участвовать в процессе собственно катализа, который может протекать как на поверхности фрагмента субстрата, так и в его глубине [9, 10]. На этой стадии взаимодействия, транспорт молекул фермента в глубину субстратного фрагмента осуществляется по механизму молекулярной диффузии.

Скорость взаимного позиционирования субстратных фрагментов и молекул фермента на двух первых этапах ферментализации определяется суммарной эффективностью конвективной и молекулярной диффузии, при этом конвективная составляющая, как правило, играет ведущую роль. [11]

Исходя из физической сущности процесса конвективной диффузии, можно предположить возможность регулирования скорости ферментализации измельченного рыбного сырья естественной влажности в результате применения принудительного течения фермент – субстратной массы.

■ Таким образом, основная **цель настоящей работы состояла в экспериментальной оценке возможности интенсификации ферментативного гидролиза рыбного сырья в результате принудительного движения фермент – субстратной массы в процессе перемешивания.**

Для достижения поставленной цели в работе рассматривались следующие задачи:

- определить характер реологического поведения измельченного рыбного сырья (зависимость эффективной вязкости от скорости сдвига);
- на основании полученных экспериментальных кривых зависимости эффективной вязкости от скорости сдвига определить индексы реологического поведения и консистенции сырьевой массы;
- рассчитать значения модифицированного критерия Рейнольдса и определить границы режимов движения сырьевой массы;
- установить параметры ферментативного гидролиза измельченной рыбной массы при различных режимах ее движения.

Материалы и методы исследования

В исследованиях, в качестве рыбного сырья использован фарш черноморского шпрота (*Sprattus sprattus phalericus*) после двукратного измельчения на волчке с диаметром отверстий зерновой решетки – 3 мм. Ферментативный гидролиз белков черноморского шпрота проводили в термостатируемой ячейке диаметром 220 мм, объемом 2000 мл, при температуре 50°C, в течение 10 часов, при естественных нейтральных значениях pH и влажности рыбного сырья препаратом микробиологического происхождения - протосубтилин ГЗХ. Высота уровня фермент – субстратной массы в ячейке составляла 50 мм. Для подавления гнилостных процессов в систему в качестве консерванта вводили 0,5% пиросульфита натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$).

Для термостатирования ячейки, как в режиме нагрева, так и в режиме охлаждения были использованы два ультратермостата УТ-15. Охлаждение ячейки было необходимо для экспериментальных режимов с длительным перемешиванием при высоких оборотах мешалки. В качестве теплоносителя для нагрева, в одном ультратермостате находилась дистиллированная вода, а для охлаждения, в другом ультратермостате, смесь охлажденного 5% водного раствора хлористого натрия и мелкоизмельченного льда из этого же раствора.

Для перемешивания фермент – субстратной массы использовалась мешалка ПЭ-8100, с плавным регулированием оборотов. Мешалка была оборудована 6-ти лопастным рабочим органом диаметром – 200 мм и высотой лопасти 40 мм.

Протекание процесса ферментализации оценивали по рассчитанному количеству гидролизованного белка.

Реологические характеристики измельченного рыбного сырья определяли при температуре 50°C с помощью ротационного вискозиметра РВ-8.

Результаты исследований и их обсуждение

Экспериментальный график зависимости эффективной вязкости от скорости сдвига фарша (субстратной массы) черноморского шпрота представлен на рис. 1.

Полученная зависимость имеет типичный для



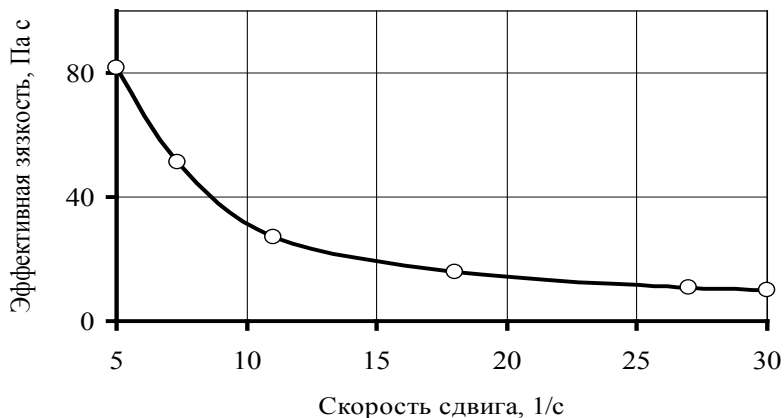


Рис. 1. Зависимость эффективной вязкости фермент – субстратной массы от скорости сдвига

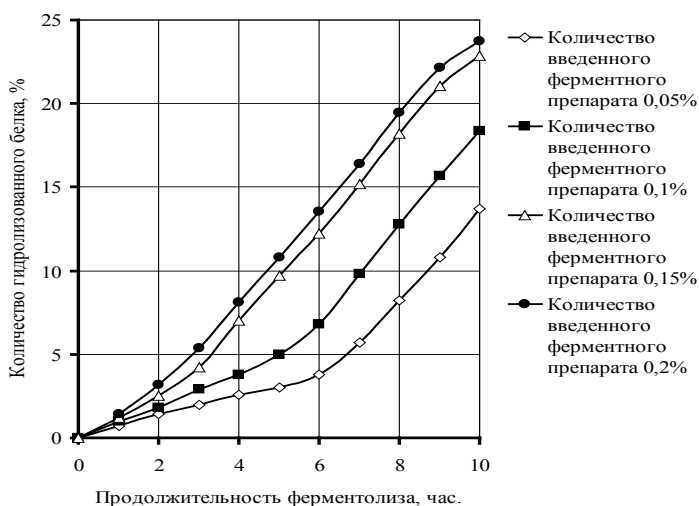


Рис. 2. Зависимость количества гидролизованного белка неподвижного субстрата от продолжительности ферментализации

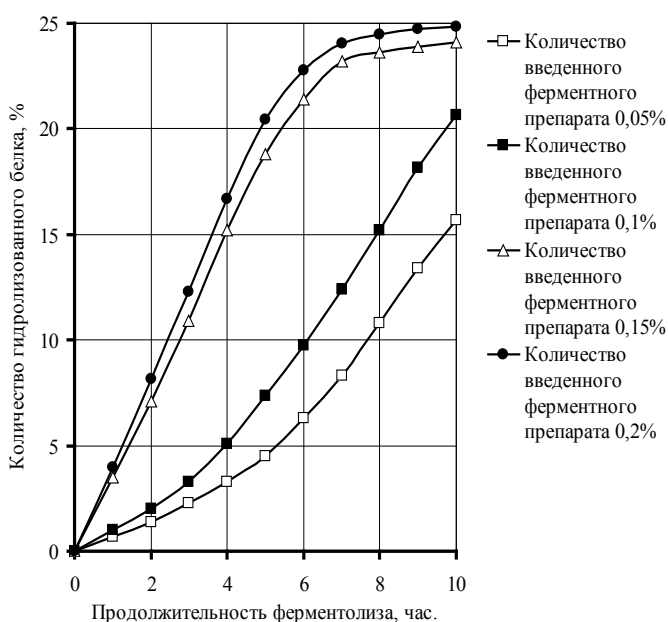


Рис. 3. Зависимость количества гидролизованного белка от продолжительности ферментализации при перемешивании субстрата. Режим работы мешалки - 20 об/мин.

псевдопластических тел убывающий характер. В результате ее аппроксимации с применением программного пакета FindGraph получена степенная зависимость, из которой определены значения индексов поведения и консистенции фермент – субстратной массы, позволяющие рассчитать значения модифицированного безразмерного критериального числа Рейнольдса применительно к случаю перемешивания псевдопластических тел [12].

Расчетные значения модифицированного числа Рейнольдса позволяют определить значения оборотов мешалки при перемешивании фермент – субстратной массы:

- ламинарный режим движения до 40 об/мин;
- переходный режим движения - 41 - 64 об/мин;
- турбулентный режим движения более 64 об/мин.

Дальнейшие исследования проводили при режимах работы мешалки – 0, 20, 45 оборотов в минуту, т.е. для неподвижной фермент–субстратной массы, ламинарного и переходного режимов ее движения. Исследования при более высоких оборотах мешалки не проводились в связи с техническими сложностями охлаждения субстрата, быстро разогревающегося при перемешивании.

Экспериментальный график зависимости количества гидролизованного белка от продолжительности процесса при отсутствии перемешивания и различном количестве введенного в систему ферментного препарата протосубтилин ГЗх представлен на рис.2.

Для всех выявленных зависимостей характерен начальный прямолинейный участок (участок разгона) на котором скорость ферментализации минимальна. [9] Низкая скорость на начальном этапе процесса, вероятно, связана с диффузионным торможением гидролиза. По мере развития процесса и, следовательно, снижения вязкости фермент–субстратной массы в результате деградации высокомолекулярных белков скорость гидролиза значительно возрастает на последующих (стационарных) этапах процесса.

Сделанное предположение о возможном диффузионном торможении процесса ферментативного гидролиза может быть подтверждено или опровергнуто на основании сравнительного анализа экспериментальных данных, полученных для неподвижной и перемешиваемой фермент-субстратной массы.

Результаты исследования динамики накопления продуктов гидролиза белков черно-

Значения скоростей реакций ферментативного гидролиза белков черноморского шпрота при различных режимах движения фермент-субстратной массы.

Режим движения фермент – субстратной массы	Массовая доля введенного ферментного препарата, %	Скорость процесса, на участке разгона, %/час.	Продолжительность участка разгона, час	Скорость процесса, на стационарном участке, %/час.
Неподвижный	0,05	0,61	6	2,49
	0,10	0,99	5	2,75
	0,15	1,39	3	2,80
	0,20	1,60	2	2,80
Ламинарный (20 об/мин)	0,05	0,89	5	2,38
	0,10	1,10	3	2,64
	0,15	*	*	3,78
	0,20	*	*	4,11
Переходный (45 об/мин)	0,05	0,88	4	2,36
	0,10	1,40	3	2,53
	0,15	*	*	3,69
	0,20	*	*	4,23

*. - участок разгона отсутствует

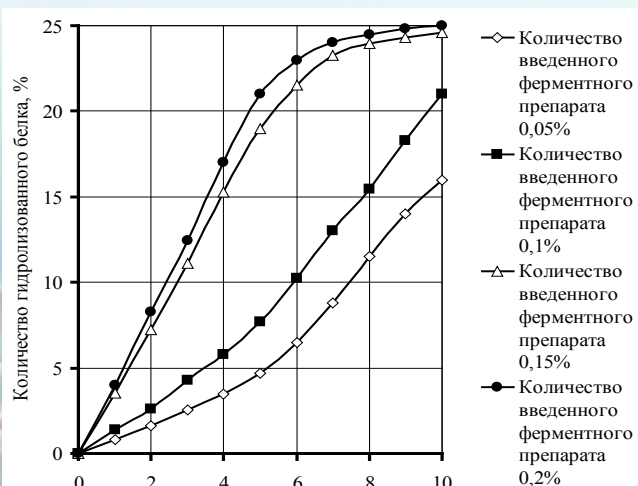


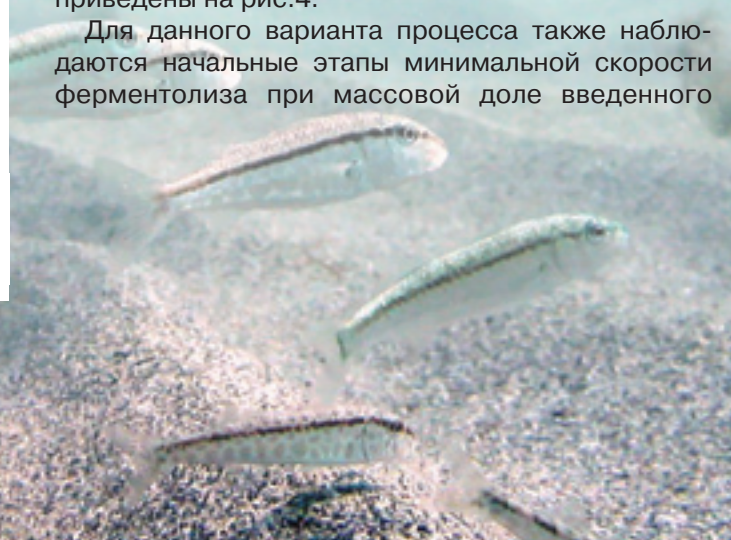
Рис.4. Зависимость количества гидролизованного белка от продолжительности ферментализации при перемешивании субстрата. Режим работы мешалки - 45 об/мин.

морского шпрота при ламинарном режиме движения (20 оборотов в минуту) фермент - субстратной массы представлены на рис.3.

Для данного режима гидролиза первоначальный прямолинейный участок минимальной скорости процесса характерен только для количества, введенного в систему фермента менее 0,1%.

Результаты аналогичных исследований, проведенных для переходного режима движения фермент – субстратной массы (45 оборотов в минуту) приведены на рис.4.

Для данного варианта процесса также наблюдаются начальные этапы минимальной скорости ферментализации при массовой доле введенного



ферментного препарата менее 0,1%. Для более высоких значений количества введенного в систему ферментного препарата участок разгона отсутствует.

Для оценки величины скорости процесса на различных этапах процесса ферментативного гидролиза при различных режимах движения фермент-субстратной массы, полученные экспериментальные зависимости на прямолинейных участках были аппроксимированы с последующим дифференцированием. Значения скоростей ферментативного гидролиза представлены.

Из анализа представленных данных следует, что ламинарный и переходный режимы движения фермент - субстратной массы, состоящей из измельченных тканей черноморского шпрота и ферментного препарата протосубтилин ГЗХ в количестве 0,05 - 0,1%, позволяют повысить скорость ферментативного гидролиза на участке разгона в 1,1-1,4 раза и сократить его продолжительность в 1,2 - 1,7 раза. В системах с ламинарным и переходным режимами движения фермент - субстратной массы и массовой долей ферментного препарата 0,15 - 0,2% участок разгона отсутствует. Ламинарный режим движения фермент - субстратной массы при массовой доле ферментного препарата 0,15% позволяет увеличить скорость гидролиза на стационарном участке процесса, по сравнению с неподвижной массой, в 1,35 раза, в то время как при массовой доле 0,2% в только в 1,31 раз. При переходном режиме движения скорость процесса возрастает в 1,47 раз при массовой доле ферментного препарата 0,15% и в 1,5 раза при количестве протосубтилина ГЗХ - 0,2%.

Заключение.

1. Экспериментально подтверждено что фарш черноморского шпрота (*Sprattus sprattus phalericus*) по своему реологическому поведению является типичным псевдопластическим телом для которого зависимость эффективной вязкости от скорости сдвига описывается степенной зависимостью.

2. На основании экспериментально установленных индексов реологического поведения и консистенции фарша из черноморского шпрота рассчитаны значения модифицированного критериального числа Рейнольдса для 6-лопастной мешалки.

3. Экспериментально подтверждено предположение о возможности регулирования скорости процесса ферментативного гидролиза в результате интенсификации конвективного массообменного процесса.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Almas K.A.** Utilization of marine biomass for production of microbial growth media and biocheemicals // *Advances in Fisheries Technology and Biotechnology for Increased*

Profitability Lancaster Technomic Publication, Comp. - 1990.

2. **Diniz A.M., Martin A.M.** 1997. Optimization of nitrogen recovery in the enzymatic hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) protein: Composition of the hydrolysates // *J. Food Sci Nutr.* - 48. - P. 191-200.
3. *Seafood flavourants produced by enzymatic hydrolysis // Advances in Fisheries Technology and Biotechnology for Increased Profitability Lancaster Technomic Publication, Comp. - 1990.*
4. **Bhaskar N., Mahendrakar N.S.** Protein hydrolysate from visceral waste proteins of Catla (*Catla catla*). Optimization of hydrolysis conditions for a commercial neutral protease // *Bioresource Technol.* - 2008. - 99(10). - P. 4105-4111.
5. **Виннов А.С.** Исследование процесса ферментативного гидролиза Азовочерноморского мелкого рыбного сырья // *Рибне господарство України.* - 2006. - №2. - С. 12-16
6. **Кучина Ю. А.** Ферментативный белковый гидролизат из путассу, полученный электрохимическим // *Рыбное хозяйство.* - 2009. - №4. - С. 115-116.
7. **Зотов К. В.** Влияние продолжительности ферментации на свойства белковых гидролизатов // *Вестник МГТУ.* - 2012. - Т. 15, №1. - С. 102-106.
8. *IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the «Gold Book»). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (2006). XML online corrected version: <http://goldbook.iupac.org>.*
9. **Байрамов В.М.** Основы химической кинетики и катализа. - М.: Издательский центр Академия, 2003. - 256с.
10. **Антонов В.К.** Химия протеолиза. Институт биорганической химии им. М.М. Шемякина Академии наук СССР. - М.: Наука, 1991. - 504с.
11. **Березин И.В.** Практический курс химической и ферментативной кинетики. - М.: Издательство МГУ, 1975. - 321с.
12. **Уонг Д., Коней Ч., Деймайн А.** Ферментация и технология ферментов. - М.: Легкая и пищевая промышленность, 1983. - 336с.

