

ТЕХНОЛОГИЯ ПРОИЗВОДСТВА И БИОКАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОГО ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА

С.Л. Тихонов¹, И.С. Брашко¹, Н.В. Тихонова¹, М.С. Тихонова², В.А. Лазарев¹

¹ Уральский государственный экономический университет, г. Екатеринбург, Россия

² Уральский государственный медицинский университет, г. Екатеринбург, Россия

Цель проведения исследования заключается в разработке технологии получения протеолитического ферментного препарата на основе коллагеназы, выделенной из внутренностей рыбы и исследование биокаталитической активности в зависимости от pH и температуры. Протеолитическую активность ферментного препарата определяли методом Ансона. Разработана технология получения ферментного препарата, включающая выделение внутренностей кеты, обработку рыбного сырья сверхвысоким давлением 100–200 МПа в течение 60 с, измельчение до частиц 500–600 мкм, экстракцию и гомогенизацию в изотоническом растворе в соотношении 1:3 при температуре 35–37 °С в течение 3–4 часов с частотой вращения 100–200 оборотов в минуту, центрифугирование (3000 об./мин); ультрафильтрацию через керамические мембраны с лимитом пропускания до 21 кДа, упаковку в полиэтиленовые пакеты емкостью 50 мл, стерилизацию сверхвысоким давлением в 300 МПа в течение 60–120 с. Температуру при экстрагировании задавали с помощью блока управления, регулирующего работу компрессора, входящего в комплексную синхронно-смесительную установку. Применяемая технология ультрафильтрации гомогенизата заключается в разделении исходного раствора, поданного в циркуляционный бак, на ферментный препарат и водный раствор, непрерывно отводящийся из аппарата. При производстве ферментного препарата по указанной технологии с целью недопущения инактивации фермента проводили контроль температурного режима при гомогенизации с помощью установления необходимой температуры, регулирующей работу компрессора с охлаждающей жидкостью. В ходе исследований установлен оптимум активности образцов ферментного препарата – pH от 7 до 9, температура от 37 до 42 °С.

Ключевые слова: пищевая биотехнология, технология производства, ферменты, ферментный препарат, коллагеназа.

Введение

Особое внимание при гидролизе коллагенсодержащих белков в пищевой отрасли привлекает коллагеназа, позволяющая раскручивать тройные спирали коллагена и расщеплять пептидные цепи до небольших остатков – олигопептидов [1–3].

Сырьем для производства протеолитических ферментных препаратов, содержащих фермент коллагеназу, являются микроорганизмы (бактерии семейства Clostridium) и железы желудочно-кишечного тракта сельскохозяйственных животных, внутренние органы рыбы, камчатского краба [4, 5]. Продуцентами коллагеназы являются патогенные микроорганизмы Clostridium histolyticum. Коллагеназы, полученные методом бактериального синтеза отличаются высокой специфичностью, повышенной каталитической способностью гидролизовать нативный, а также модифицированный коллаген [6, 7]. Выделяют

следующие изоформы коллагеназы, соответствующие первому классу I (α , β , γ) и второму классу II (δ , ϵ , ζ). Следует отметить, что изоформы β и ζ отличаются высокой молекулярной массой, а изоформы α , γ , δ и ϵ имеют низкую молекулярную массу за счет усечения полипептидной цепи [8].

Согласно классификации, принятой Комитетом Международного союза биохимии и молекулярной биологии, коллагеназы, полученные бактериальным синтезом, относятся к семейству M9 подсемейства M9A и M9B типа M09.002 (коллагеназа I) и M09.003 (коллагеназа II) металлопептидаз MEROPS, родов Vibrio и Clostridium.– M9A и M9B. Такие коллагеназы имеют номер EC 3.4.24.3 [9].

Биосинтез коллагеназы проводят путем культивирования продуцентов на питательных средах, содержащих мясопептонный бульон, аминокислоты и другие вещества. Вместе с тем отмечается тенденция производ-

ства коллагеназы путем культивирования микроорганизмов на растительных пептонах [10, 11].

Но вместе с тем, биосинтез коллагеназы бактериями рода *Clostridium* имеет недостаток – одновременно происходит синтез целого ряда протеолитических ферментов, в частности, клострипаин, эластаза, желатиназа и др., что не позволяет проводить эффективное получение заданного фермента [12]. Более того, клострипаин разрушает коллагеназу, так как она является для него субстратом [13].

При анализе рынка протеолитических ферментных препаратов, предназначенных для использования в биотехнологических, медицинских, ветеринарных и косметических целях, содержащих фермент коллагеназу, установлено, что в составе ферментных препаратов содержатся ферменты, продуцируемые бактериями рода *Clostridium* или содержащимися в пищеварительном тракте рыб и камчатского краба [14, 15].

В связи с этим **целью** исследования является разработка технологии получения протеолитического ферментного препарата на основе коллагеназы, выделенной из внутренностей рыбы и исследование биокаталитической активности в зависимости от pH и температуры.

Объекты и методы исследований

Протеолитическую активность (ПА) ферментного препарата определяли методом Ансона по ГОСТ 20264.2-88 рассчитывали по формуле, в качестве субстрата использовали коллаген, pH устанавливали с помощью фосфатно-буферного раствора, за единицу проте-

олитической активности брали количество фермента, которое катализирует переход в не осаждаемый трихлоруксусной кислотой осадок – количество субстрата, содержащее 1 мкмоль тирозина:

$$ПА = \frac{c \times D \times 1000}{TЭ \times 10 \times m}, \quad (1)$$

где c – отношение объемов реакционной смеси и раствора ферментного препарата после добавления трихлоруксусной кислоты; D – оптическая плотность раствора; $TЭ$ – тирозиновый эквивалент, определяемый по калибровочной прямой (мкмоль/см³); 10 – продолжительность гидролиза (мин); m – масса ферментного препарата для реакции в 1 см³ раствора (мг); 1000 – коэффициент пересчета мг в г.

За 100 % активности исследуемого ферментного препарата брали максимальную определенную нами активность 543 ед./г.

Обработку сырья сверхвысоким давлением проводили с помощью гидростата, принципиальная схема которого представлена на рис. 1.

Установка для обработки рыбного сырья сверхвысоким давлением представляет собой рабочую камеру, заполненную жидкостью (дистиллированной водой и глицериновым маслом), которая является средой, передающей давление на продукт. Для создания давления используется мощный гидравлический насос. Рабочая камера выполнена из стали с толщиной стенок 5–10 см в зависимости от величины давления, которое создается в ней. В рабочую камеру вмонтирован клапан, через который выходит воздух при заполнении ка-

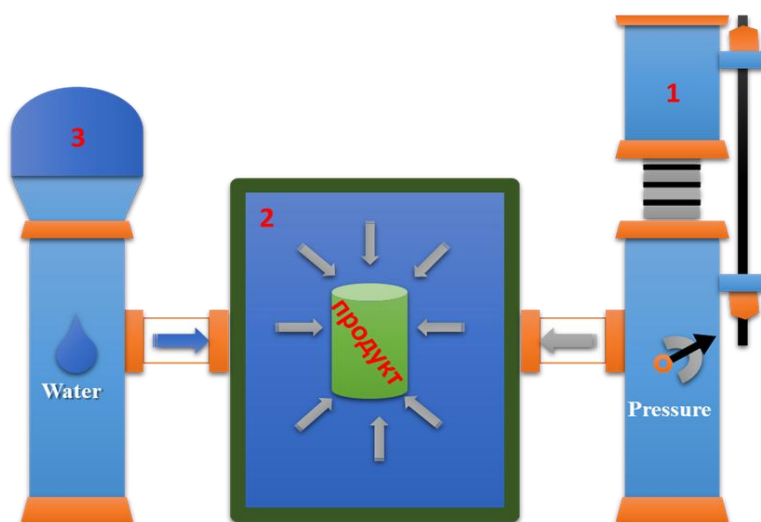


Рис. 1. Принципиальная схема установки для обработки сырья

Пищевые ингредиенты, сырье и материалы

меры продуктом и передаточной жидкостью. После того, как в камере давление достигло требуемой величины, начинается декомпрессия, путем открытия выпускного клапана. Пищевой продукт в рабочей камере равномерно обрабатывается сверхвысоким давлением со всех сторон. Для обработки сверхвысоким давлением следует отбирать сырье с высоким содержанием воды, в частности, органы пищеварительной системы рыбы. При обработке сырья сверхвысоким давлением отмечается некоторое повышение температуры, так как при возрастании давления совершается работа и, соответственно, происходит некоторое нагревание продукта, поэтому, в нашей технологии лучше использовать замороженное рыбной сырье.

Также при рассмотрении влияния сверхвысокого давления на сырье целесообразно рассмотреть возможность использования различных видов упаковки.

К упаковке предъявляются следующие требования:

- не должна иметь незаполненных пространств или содержать воздух (необходимо упаковывать в вакуумной машине);
- упаковочный материал должен быть прочным, гибким, обладать обратимой деформацией и быть без структурных повреждений.

Экстракцию и гомогенизацию рыбного сырья, обработанного сверхвысоким давлением, осуществляли в универсальной синхронно-смесительной установке на кафедре пищевой инженерии Уральского государственного экономического университета. Используемая установка предназначена для выполнения комплексных задач по смешиванию, эмульгированию, охлаждению, пастеризации (рис. 2).

Экстракцию и гомогенизацию проводили в изотоническом растворе в соотношении 1:3 при температуре 35–37 °С в течение 3–4 часов с частотой вращения лопастей 100–200 оборотов в минуту. Температуру задавали с помощью блока управления, регулирующего работу компрессора, входящего в комплексную синхронно-смесительную установку. При нормальном режиме работы происходит циклический опрос всех датчиков, подключенных к системе, все данные передаются на компьютер, подключенному к устройству. На дисплей выводится текущая температура. Температура сырья устанавливается с помощью кнопки «Охлаждение» на блоке управления,

или «Нагрев» в ручном режиме, или с помощью установленной на компьютере программы. Процесс смешивания также аналогично контролируется с помощью компьютерной программы и кнопки «Смеситель», которая включает соответствующее устройство, состояние каждого исполнительного элемента индицируется соответствующим светодиодом и индикатором дисплея. Работа всех кнопок дублируется на компьютере. С помощью режима «Редактирование настроек» устанавливается необходимая температура смешивания и частота вращения лопастей в смесителе.



Рис. 2. Универсальная синхронно-смесительная установка

Процесс ультрафильтрации проводили в лабораторных условиях на установке, представленной на рис. 3.

Установка ультрафильтрации состоит из следующих основных узлов и элементов. Циркуляционный бак 1 объемом 50 литров предназначен для загрузки исходного ферментного раствора и слива готового продукта после ультрафильтрации. Милливольтметр 2 необходим для наблюдения за температурой раствора в процессе ультрафильтрации посредством контроля электродвижущей силы, наводимой в соединенной с ним термопаре 6 типа «хромель-алюмель». Для компенсации влияния температуры окружающей среды использован классический сосуд Дьюара 3 в виде герметич-

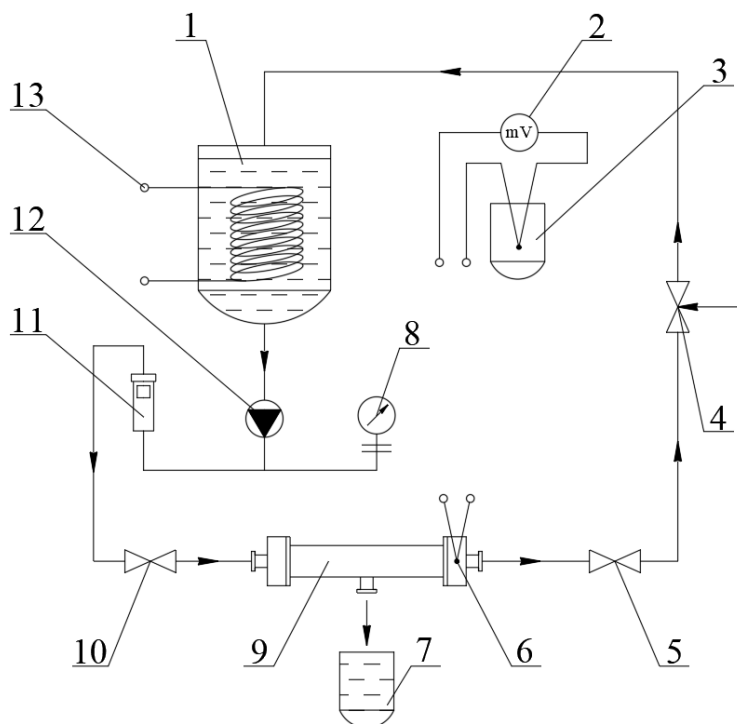


Рис. 3. Схема установки для получения раствора ферментного препарата методом ультрафильтрации: 1 – бак для исходного раствора/готового концентрата; 2 – милливольтметр; 3 – сосуд Дьюара; 4 – регулировочный вентиль; 5, 10 – вентили; 6 – термометр; 7 – сосуд для отвода пермеата; 8 – манометр с разделителем; 9 – ультрафильтрационная ячейка; 11 – ротаметр; 12 – насос; 13 – змеевик

ной емкости из пенопласта с помещенным во-
внутри льдом. Регулировочный вентиль 4
предназначен для управления давлением внут-
ри контура при работе установки. Вентили 5 и
10 предназначены для герметичного отклю-
чения части контура системы при сборке и раз-
борке ультрафильтрационной ячейки 9. Сосуд
7 предназначен для отвода пермеата в процессе
получения ферментного препарата. Ротаметр
11 предназначен для определения расхода ис-
ходного раствора сырья. Центробежный насос
12 служит для создания давления в контуре и
обеспечивает необходимую для ультрафильт-
рации скорость потока ферментного препарата.
Змеевик 13 служит для изменения температуры
раствора в процессе работы установки с помо-
щью подачи через него воды заранее известной
температуры.

Все металлические детали установки,
контактирующие с раствором, выполнены из
нержавеющей стали 12Х18Н10Т. Основным
рабочим элементом установки является ульт-
рафильтрационная ячейка 9. Она представляет
собой цилиндр длиной 900 миллиметров, в

который помещаются керамические мембраны
КУФЭ длиной 800 миллиметров с размером
пор 21 кДа, изготовленные из диоксида титана
анатазной модификации с напыленным селек-
тивным слоем α -оксида алюминия.

Работа установки заключается в разделе-
нии исходного раствора, поданного в цирку-
ляционный бак, на ферментный препарат и
водный раствор, непрерывно отводящийся из
аппарата.

Результаты и их обсуждение

Разработана технология получения фер-
ментного препарата:

- выделение внутренностей кеты;
- обработка сверхвысоким давлением 100–200 МПа в течение 60 с;
- измельчение до частиц 500–600 мкм;
- экстракция и гомогенизация в изотоническом растворе в соотношении 1:3 при температуре 35–37 °С в течение 3–4 часов с частотой вращения 100–200 оборотов в минуту;
- центрифугирование (3000 об./мин);
- ультрафильтрация через керамические мембраны с лимитом пропускания до 21 кДа;

Пищевые ингредиенты, сырье и материалы

– упаковка в полиэтиленовые пакеты емкостью 50 мл;

– стерилизация сверхвысоким давлением в 300 МПа в течение 60–120 с.

В технологии получения ферментного препарата использован процесс гомогенизации, позволяющий в результате механического воздействия разрушить лизосомы клеток внутренних органов рыбы, где локализуются протеолитические ферменты в неактивной форме (иначе активные ферменты гидролизовали бы клетки рыбы), следует отметить, что предварительное измельчение внутренних органов рыбы увеличивает скорость экстракции ферментов в раствор, что согласуется с результатами исследований [16].

Используемая нами мембранная ультрафильтрация гомогенизата внутренних органов рыбы позволяет удалить из раствора нерастворимые липидно-белковые комплексы с большой молекулярной массой, что согласуется с исследованиями [17].

Предложенная технология выделения фермента из отходов рыбного сырья (внутренностей) будет экономически целесообразной по сравнению с ферментами микробного синтеза, в частности, микробной коллагеназой, так как источник сырья – отходы рыбной промышленности достаточно доступны и дешевы, что согласуется с результатами исследований [18]. Обработка полученного ферментного препарата сверхвысоким давлением позволяет увеличить его стабильность при хранении, путем бактерицидного действия на

микрофлору, что доказано в исследованиях [19] по обработке животного сырья высоким давлением в сочетании с активной упаковкой на основе эфирного масла. Установленный автором [20] синергетический эффект применяемых воздействий способствует снижению количества *L. monocytogenes* ниже предела обнаружения в течение 60 суток хранения при низких положительных температурах (от 0 до 4 °С). Однако при повышении температуры хранения до 8 °С рост *L. monocytogenes* возобновлялся. Следовательно, полученный ферментный препарат следует хранить при низких положительных температурах – менее 4 °С. Об эффективности обработки высоким давлением в отношении снижения общего количества аэробных и молочнокислых бактерий в сырье животного происхождения сообщается в работе [21].

На рис. 4 представлено влияние рН на активность фермента ферментного препарата при температуре 40 °С.

Из рис. 4 следует, что активность ферментного препарата зависит от рН и максимальная активность (100 %) при рН на уровне 8. Сдвиг рН в щелочную сторону приводит к снижению активности. Так, активность ферментного препарата при рН 10 составляет 85 %. Оптимум активности образцов ферментного препарата наблюдается при рН от 7 до 9.

На рис. 5 представлено влияние температуры на активность ферментного препарата при установленном нами оптимуме рН 8.

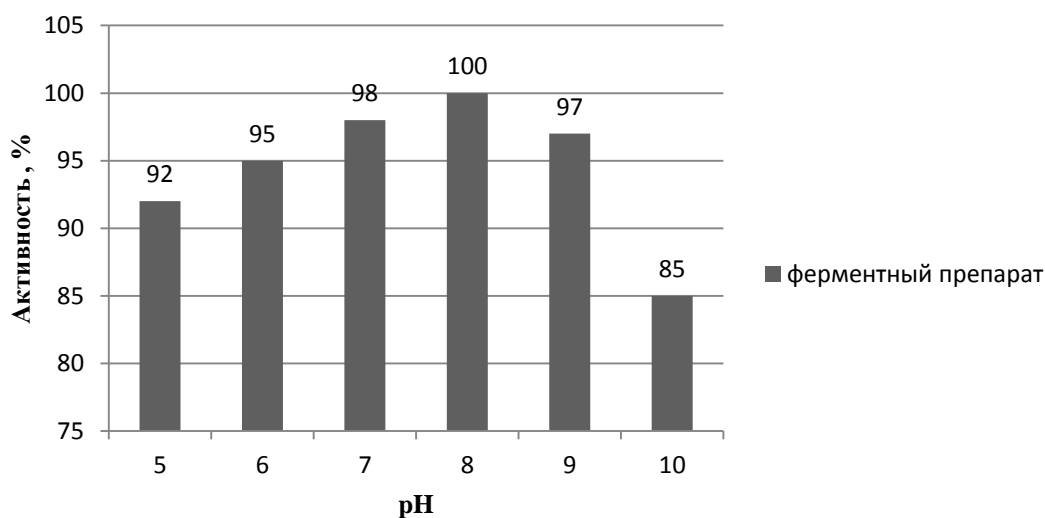


Рис. 4. Влияние рН на активность ферментного препарата при температуре 40 °С, %

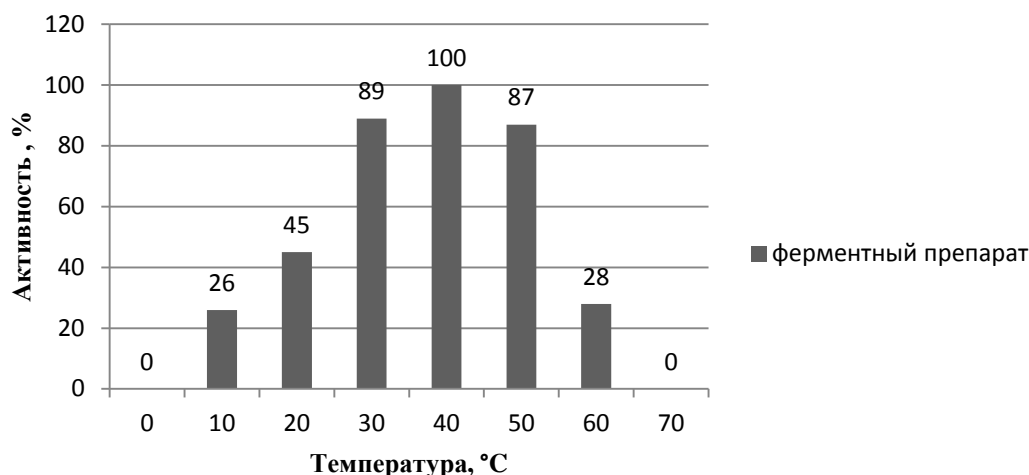


Рис. 5. Влияние температуры на ферментный препарат при оптимальном pH 8

Повышение температуры до определенных пределов увеличивает скорость любой химической реакции, так как с повышением температуры увеличивается скорость движения молекул и, соответственно, взаимодействие химических веществ, ускоряется скорость реакции. Но для реакции с участием фермента-катализатора характерен температурный оптимум, при превышении которого происходит денатурация активного центра фермента. Установлено, что оптимум каталитической активности ферментного препарата находится при температурном режиме от 37 до 42 °C. Результаты исследований согласуются с данными [21, 22] по аналогичному влиянию pH и температуры на протеолитическую активность ферментного препарата, сходного по эффективности с коллагеназой и имеющего полный набор протеиногенных аминокислот с преобладанием аспаргина и глутамина.

Выводы

Разработана технология производства ферментного препарата из рыбного сырья, включающая обработку органов пищеварительной системы рыбы кеты сверхвысоким давлением 100–200 МПа в течение 60 с, измельчение сырья с последующей экстракцией и гомогенизацией в изотоническом соотношении 1:3 при температуре 35–37 °C в течение 3–4 часов с частотой вращения 100–200 оборотов в минуту, центрифугирование ультрафильтрации через керамические мембраны с лимитом пропускания до 21 кДа, упаковка в полиэтиленовые пакеты емкостью 50 мл и стерилизация сверхвысоким давлением. При

производстве ферментного препарата по указанной технологии с целью недопущения инактивации фермента проводится контроль температурного режима при гомогенизации с помощью установления необходимой температуры, регулирующей работу компрессора с охлаждающей жидкостью. Используемая технология ультрафильтрации гомогенизата заключается в разделении исходного раствора, поданного в циркуляционный бак, на ферментный препарат и водный раствор, непрерывно отводящийся из аппарата. При ультрафильтрации гомогенизата регуляции температуры использован классический сосуд Дьюара в виде герметичной емкости из пенопласта с помещенным вовнутрь льдом. В результате исследований установлено влияние pH и температуры на биокаталитическую активность ферментного препарата. Определен оптимум pH (7–9) активности ферментного препарата. Сдвиг pH в щелочную сторону приводит к снижению активности. Установлено, что оптимум каталитической активности ферментного препарата находится при температурном режиме от 37 до 42 °C.

Литература

1. Egui Rojo M.A., Moncada Iribarren I., Carballido Rodriguez J., Martinez-Salamanca J.I. Experience in the use of collagenase *Clostridium histolyticum* in the management of Peyronie's disease: current data and future prospects // *Therapeutic Advances in Urology*. 2014. Vol. 6, No. 5. P. 192–197. DOI: 10.1177/1756287214537331

2. Murphy A., Lalonde D.H., Eaton C. et al. Minimally invasive options in Dupuytren's contracture: aponeurotomy, enzymes, stretching, and fat grafting // *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2014. Vol. 134, No. 5. P. 822–829.
3. Eckhard U., Huesgen P.F., Brandstetter H., Overall C.M. Proteomic protease specificity profiling of clostridial collagenases reveals their intrinsic nature as dedicated degraders of collagen // *Journal of Proteomics*. 2014. Vol. 100. P. 102–114.
4. Daboor S.M., Budge S.M., Ghaly A.E. et al. Isolation and activation of collagenase from fish processing waste // *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 2012. Vol. 3. P. 191–203.
5. Souchet N., Laplante S. Recovery and characterization of a serine collagenolytic extract from snow crab (*Chionoecetes opilio*) byproducts // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2011. Vol. 163. P. 765–779.
6. Руденская Г.Н., Можина Н.В. Коллагенолитические ферменты патогенных микроорганизмов // *Биомедицинская химия*. 2004. № 6. С. 539–553.
7. Pat. WO 2013177647 A1 Meio de cultura para bactérias do gênero clostridium livre de componentes de origem animal e processo para produção de sobrenadantecontendoumaoumais proteases com atividadecolagenolítica e gelatinolítica / M.C. Alegria, L.C. Fardelone, M.B.R. Delalana, J.E. Thiemann, F.S. Astolfi, R.C.D. Moreira, O. De Castro Pacheco. 5 December 2013.
8. Pat. US 8715985 B2 Clostridium histolyticum recombinant collagenases and method for the manufacture thereof / F. Bertuzzi, A. Cuttitta, G. Ghersi, S. Mazzola, M. Salamone, G. Seidita. 6 May 2014.
9. Duarte A.S., Correia A., Esteves A.C. Bacterial collagenases: A review // *Critical Reviews in Microbiology*. 2014. Epub ahead of print.
10. Certificate of Origin Policy (TSE/BSE) 01-000-014 Rev. 1 Effective Date: August 3, 2005 // Sigma-Aldrich. URL: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/countries/italy/certOfOriginPolicy.pdf> (accessed: 01.07.2015).
11. Pat. WO 2013177647 A1 Meio de cultura para bactérias do gênero clostridium livre de componentes de origem animal e processo para produção de sobrenadantecontendoumaoumais proteases com atividadecolagenolítica e gelatinolítica / M.C. Alegria, L.C. Fardelone, M.B.R. Delalana, J.E. Thiemann, F.S. Astolfi, R.C.D. Moreira, O. De Castro Pacheco. 5 December 2013.
12. Jozwiak J., Grzela T., Jankowska-Steifer E. et al. Lethal factor of Clostridium histolyticum kills cells by apoptosis // *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 2007. Vol. 49. P. 296–303.
13. Wang H., Van Blitterswijk C.A., Bertrand-De Haas M. et al. Improved enzymatic isolation of fibroblasts for the creation of autologous skin substitutes // *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*. 2004. Vol. 40. No. 8–9. P. 268–277.
14. Патент 2484811 РФ МПК А61К 38/43 Ферментный ранозаживляющий препарат / Демина Н.С., Рототаев Д.А. (РФ) – № 2011133921, заявл. 15.08.2011, опубл. 20.06.13.
15. Патент 2280076 РФ С12N9/48 С12N9/64 Ферментный препарат из гепатопанкреаса промысловых видов крабов и способ его получения: на изобретение / Артюков А.А., Мензорова Н.И., Козловская Э.П., Кофанова Н.Н., Козловский А.С., Рассказов В.А. (РФ) – № 2004135771/13, заявл. 06.12.04.; опубл. 20.07.2006.
16. Патент РФ № 2610669 Способ получения протеолитического препарата для медицинского применения Авторы: Зайчук Марина Патентообладатель: Общество с ограниченной ответственностью «Научно-исследовательский институт средств противожоговой терапии» (RU) Дата подачи заявки: 16.10.2015. Опубл.: 14.02.2017. Бюл. № 5.
17. Патент RU №2352634 С12N9/00 Способ получения ферментного препарата из рыбного сырья. Авторы: Артюхов И.Л., Иванушко С.Н., Коваль С.Я., Черевко Е.А. Патентообладатель: ООО «Дальтехфермент» (RU). Дата подачи заявки: 15.11.2007 опубл. 20.04.2009.
18. Daboor S.M., Budge S.M., Chaly A.E., et al. Extraction and Purification of Collagenase Enzymes: A Critical Review // *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. 6 (4): 239–263, 2010.
19. Andreou V., Tsironi, T., Dermesonlouoglou, E., Katsaros, G., Taoukis, P.S. (2018). Combinatory effect of osmotic and high pressure process in on shelf life extensions animal origin products – Application to child characteristics // *Food Packaging and Shelf Life*, 15, 43–51. DOI: 10.1016/j.fpsl.2017.11.002

20. Stratakos, A.C., Delgado-Pando, G., Linton, M., Patterson, M.F., Koidis, A. (2015). Synergism between high-pressure processing and active packaging against listeria monocytogenes in ready-to-eat chicken breast // *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 27, 41–47. DOI: 10.1016/j.ifset.2014.11.005

21. Антипова, Л.В. Физико-химические и биокаталитические свойства протеолитического комплекса препарата «Протепсин» /Л.В.

Антипова, М.В. Горбунков // Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий. 2016. № 1. С. 89–93. DOI: 10.20914/2310-1202-2016-1-89-95

22. Antipova, L.V. The experience of enzyme preparations application in the processing of animal origin raw materials / L.V. Antipova, M.Y.Gorbunkov, S.A. Storublevtsev // *European Journal of Natural History*. 2015. № 2. P. 42–43.

Тихонов Сергей Леонидович, заведующий кафедрой пищевой инженерии, д-р техн. наук, профессор, Уральский государственный экономический университет (г. Екатеринбург), tihonov75@bk.ru

Брашко Иван Сергеевич, аспирант 2 курса кафедры пищевой инженерии, Уральский государственный экономический университет (г. Екатеринбург), ivanbrashko@yandex.ru

Тихонова Наталья Валерьевна, д-р техн. наук, профессор кафедры пищевой инженерии, Уральский государственный экономический университет (г. Екатеринбург), tihonov75@bk.ru

Тихонова Мария Сергеевна, студентка, Уральский государственный медицинский университет (г. Екатеринбург), tihonov75@bk.ru

Лазарев Владимир Александрович, канд. техн. наук, доцент кафедры пищевой инженерии, Уральский государственный экономический университет (г. Екатеринбург), lazarev.eka@gmail.com

Поступила в редакцию 3 февраля 2021 г.

DOI: 10.14529/food210203

PRODUCTION TECHNOLOGY AND BIOCATALYTIC PROPERTIES OF PROTEOLYTIC ENZYME PREPARATION

S.L. Tikhonov¹, I.S. Brashko¹, N.V. Tikhonova¹, M.S. Tikhonova², V.A. Lazarev¹

¹ Ural State University of Economics, Ekaterinburg, Russian Federation

² Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russian Federation

The purpose of the study is to develop a technology for obtaining a proteolytic enzyme preparation based on collagenase isolated from the entrails of fish and to study the biocatalytic activity depending on pH and temperature. The proteolytic activity of the enzyme preparation was determined by the Anson method. A technology for producing an enzyme preparation has been developed, which includes isolation of chum salmon entrails, processing of fish raw materials with an ultra-high pressure of 100–200 MPa for 60 seconds, grinding to particles of 500–600 microns, extraction and homogenization in an isotonic solution in a ratio of 1:3 at a temperature of 35–37 °C for 3–4 hours with a rotation frequency of 100–200 revolutions per minute, centrifugation (3000 rpm); ultrafiltration through ceramic membranes with a transmission limit of up to 21 kDa, packaging in plastic bags with a capacity of 50 ml, sterilized with an ultra-high pressure of 300 MPa for 60–120 seconds. The activity of the enzyme preparation was determined by the express method, which consists in hydrolysis of gelatin with a collagenase solution. As a result of the study, a technology for the production of an enzyme preparation from fish raw materials treated with an ultrahigh pressure of 100–200 MPa for 60 seconds was developed. The enzyme preparation was controlled using a temperature regime in order to prevent inactivation of the enzyme. Extraction and homogenization were carried out in an isotonic solution in a ratio of 1:3 at a temperature of 35–37 °C for 3–4 hours with a blade rotation speed of 100–200 revolutions per minute. The temperature during

extraction was set using a control unit that regulates the operation of the compressor, which is part of a complex synchronous mixing unit. The applied technology of ultrafiltration of homogenizate consists in the separation of the initial solution supplied to the circulation tank into an enzyme preparation and an aqueous solution continuously discharged from the apparatus. When producing an enzyme preparation using this technology, in order to prevent the inactivation of the enzyme, the temperature regime during homogenization was monitored by setting the necessary temperature that regulates the operation of the compressor with the cooling liquid. During ultrafiltration of the temperature control homogenizate, a classic Dewar vessel in the form of a sealed foam container with ice placed inside was used. The influence of pH and temperature on the biocatalytic activity of the enzyme preparation was established in the course of the studies. optimum of the activity of the samples of the enzyme preparation-observed at a pH of 7 to 9 of the activity of the enzyme preparation, temperature. The pH shift to the alkaline side leads to a decrease in activity. It was found that the optimum of the catalytic activity of the enzyme preparation is at a temperature range of 37 to 42 °C.

Keywords: food biotechnology, production technology, enzymes, enzyme preparation, collagenase.

References

1. Egui Rojo M.A., Moncada Iribarren I., Carballido Rodriguez J., Martinez-Salamanca J.I. Experience in the use of collagenase *Clostridium histolyticum* in the management of Peyronie's disease: current data and future prospects. *Therapeutic Advances in Urology*, 2014, vol. 6, no. 5, pp. 192–197. DOI: 10.1177/1756287214537331
2. Murphy A., Lalonde D.H., Eaton C. et al. Minimally invasive options in Dupuytren's contracture: aponeurotomy, enzymes, stretching, and fat grafting. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 2014, vol. 134, no. 5, pp. 822–829.
3. Eckhard U., Huesgen P.F., Brandstetter H., Overall C.M. Proteomic protease specificity profiling of clostridial collagenases reveals their intrinsic nature as dedicated degraders of collagen. *Journal of Proteomics*. 2014, vol. 100, pp. 102–114. DOI: 10.1016/j.jprot.2013.10.004
4. Daboor S.M., Budge S.M., Ghaly A.E. et al. Isolation and activation of collagenase from fish processing waste. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 2012, vol. 3, pp. 191–203. DOI: 10.4236/abb.2012.33028
5. Souchet N., Laplante S. Recovery and characterization of a serine collagenolytic extract from snow crab (*Chionoecetes opilio*) byproducts. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2011, vol. 163, pp. 765–779. DOI: 10.1007/s12010-010-9081-2
6. Rudenskaya G.N., Mozhina N.V. Kollagenoliticheskie fermenty patogennyh mikroorganizmov. *Biomedicinskayahimiya*, 2004, no. 6, pp. 539–553.
7. at. WO 2013177647 A1 Meio de cultura para bactérias do gênero *clostridium* livre de componentes de origem animal e processo para produção de sobrenadantecontendoumaoumais proteases com atividadecolagenolítica e gelatinolítica / M.C. Alegria, L.C. Fardelone, M.B.R. Delalana, J.E. Thiemann, F.S. Astolfi, R.C.D. Moreira, O. De Castro Pacheco. 5 December 2013
8. Pat. US 8715985 B2 *Clostridium histolyticum* recombinant collagenases and method for the manufacture thereof / F. Bertuzzi, A. Cuttitta, G. Gherzi, S. Mazzola, M. Salamone, G. Seidita. 6 May 2014.
9. Duarte A.S., Correia A., Esteves A.C. Bacterial collagenases: A review. *Critical Reviews in Microbiology*, 2014. Epub ahead of print
10. Certificate of Origin Policy (TSE/BSE) 01-000-014 Rev. 1 Effective Date: August 3, 2005. *Sigma-Aldrich*. Available at: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/countries/italy/certOfOriginPolicy.pdf> (accessed: 01.07.2015).
11. Pat. WO 2013177647 A1 Meio de cultura para bactérias do gênero *clostridium* livre de componentes de origem animal e processo para produção de sobrenadantecontendoumaoumais proteases com atividadecolagenolítica e gelatinolítica / M.C. Alegria, L.C. Fardelone, M.B.R. Delalana, J.E. Thiemann, F.S. Astolfi, R.C.D. Moreira, O. De Castro Pacheco. 5 December 2013.
12. Jozwiak J., Grzela T., Jankowska-Steifer E. et al. Lethal factor of *Clostridium histolyticum* kills cells by apoptosis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2007, vol. 49, pp. 296–303. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2006.00204.x
13. Wang H., Van Blitterswijk C.A., Bertrand-De Haas M. et al. Improved enzymatic isolation of fibroblasts for the creation of autologous skin substitutes. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*, 2004, vol. 40, no. 8–9, pp. 268–277. DOI: 10.1290/0408055.1

14. Patent 2484811 RF MPK A61K 38/43 *Fermentnyj ranozazhivlyayushchij preparat* / Demina N.S., Rototaev D.A. (RF) – №2011133921, zayavl. 15.08.2011, opubl. 20.06.13.
15. Patent 2280076 RF C12N9/48 C12N9/64 *Fermentnyj preparat iz gepa-topankreasa promyslovyh vidov krabov I sposob ego polucheniya: na izobretenie* / Artyukov A.A., Menzorova N.I., Kozlovskaya E.P., Kofa-nova N.N., Kozlovskij A.S., Rasskazov V.A. (RF) – № 2004135771/13, zayavl. 06.12.04; opubl. 20.07.2006.
16. RF Patent No. 2610669 Method for obtaining a proteolytic drug for medical use Authors: Marina Zaichuk Patent holder: Limited Liability Company "Research Institute of Anti-burn Therapy" (RU) Date of application: 16.10.2015 Publ.: 14.02.2017 Byul. no. 5
17. RF Patent No. 2352634 C12N9/00 Method for obtaining an enzyme preparation from fish raw materials, Authors: Artyukhov I. L., Ivanushko S. N., Koval S. Ya., Cherevko E. A. Patent holder: Limited Liability Company "Daltehferment" (RU) Date of application: 15.11.2007 publ. 20.04.2009
18. Dabur S. M., Budj S. M., Chaly et al. Extraction and purification of collagenase enzymes: A critical review. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 6 (4): 239–263, 2010.
19. Andreou, V., Tsironi, T., Dermesonlouoglou, E., Katsaros, G., Taoukis, P.S. (2018). The combinatorial effect of the osmotic and high pressure process on the extension of the shelf life of animal products-Application to children's characteristics. *Food packaging and shelf life*, 15, 43–51. DOI: 10.1016/j.fpsl.2017.11.002
20. Stratakos, A.C., Delgado-Pando, G., Linton, M., Patterson, M.F., Koidis, A. (2015). Synergy between high-pressure processing and active packaging against listeria monocytogenes in ready-to-eat chicken breast. *Innovative Food Science and New Technologies*, 27, 41–47. DOI: 10.1016/j.ifset.2014.11.005
21. Antipova, L.V., Gorbunkov M.V. Physico-chemical and biocatalytic properties of the proteolytic complex of the drug "Protepsin". *Bulletin of the Voronezh State University of Engineering Technologies*, 2016, no. 1, pp. 89–93. DOI: 10.20914/2310-1202-2016-1-89-95
22. Antipova, L.V., Gorbunkov M.Yu., Storublevtsev S.A. Experience of the use of enzyme preparations in the processing of raw materials of animal origin. *European Journal of Natural History*, 2015, no. 2, pp. 42–43.

Sergey L. Tikhonov, head of the Department of food engineering, Doctor of Engineering, Professor, Ural State University of Economics, Ekaterinburg, tihonov75@bk.ru

Ivan S. Brashko, graduate student, Ural State University of Economics, Ekaterinburg, ivanbrashko@yandex.ru

Natalya V. Tikhonova, Doctor of Engineering, Professor, Ural State University of Economics, Ekaterinburg, tihonov75@bk.ru

Maria S. Tikhonova, student, Ural State Medical University, Ekaterinburg, tihonov75@bk.ru

Vladimir A. Lazarev, PhD in Engineering, Associate Professor, Ural State University of Economics, Ekaterinburg, lazarev.eka@gmail.com

Received February 3, 2021

ОБРАЗЕЦ ЦИТИРОВАНИЯ

Технология производства и биокаталитические свойства протеолитического ферментного препарата / С.Л. Тихонов, И.С. Брашко, Н.В. Тихонова и др. // Вестник ЮУрГУ. Серия «Пищевые и биотехнологии». – 2021. – Т. 9, № 2. – С. 26–35. DOI: 10.14529/food210203

FOR CITATION

Tikhonov S.L., Brashko I.S., Tikhonova N.V., Tikhonova M.S., Lazarev V.A. Production Technology and Biocatalytic Properties of Proteolytic Enzyme Preparation. *Bulletin of the South Ural State University. Ser. Food and Biotechnology*, 2021, vol. 9, no. 2, pp. 26–35. (in Russ.) DOI: 10.14529/food210203