

Научная статья

УДК 543.645.6

EDN GZJXUU

<https://doi.org/10.22450/1999-6837-2024-18-4-113-119>

Исследование белковых фракций вторичного продовольственного сырья

Сергей Леонидович Тихонов¹, Наталья Валерьевна Тихонова²

¹ Уральский государственный лесотехнический университет

Свердловская область, Екатеринбург, Россия

^{1,2} Уральский государственный аграрный университет

Свердловская область, Екатеринбург, Россия

¹ tihonov75@bk.ru

Аннотация. Пептиды, выделенные из гидролизатов рыбного белка, могут использоваться в пищевых системах в качестве функциональных ингредиентов специализированной пищевой продукции. Проведено исследование по определению фракционного состава и аминокислотной последовательности белка внутренностей горбуши. В качестве объекта исследований использовали измельченные внутренности охлажденной горбуши. Для выделения белков были применены методы высаливания с сульфатом аммония. Последовательность аминокислот в пептиде определяли масс-спектрометрическим методом. Во внутренностях охлажденной горбуши выделено две белковые фракции. Аминокислотная последовательность фракции 1 составляет 194 аминокислоты, фракции 2 – 134 аминокислоты. В последовательностях находятся определенные повторяющиеся аминокислотные мотивы, в частности CC, EE, YY, VV, PP, AA, LL, NM, PPE, CYR и другие, указывающие на наличие структурных или функциональных областей в составе белка, которые могут иметь значимое биологическое действие с клетками мишениями. Для дальнейшего выделения и идентификации биологически активных пептидов из аминокислотных последовательностей белковых фракций целесообразно провести заданное прогнозирование гидролиза белка (*in silico*) с последующим пептидомическим анализом, основанным на масс-спектрометрии, что позволяет провести мониторинг содержания уже известных пептидов во фракциях; в тоже время указанное прогнозирование необходимо в качестве инструмента для обнаружения новых биоактивных пептидов.

Ключевые слова: белковые фракции, пептиды, вторичное продовольственное сырье, аминокислотная последовательность, заданное прогнозирование гидролиза белка

Для цитирования: Тихонов С. Л., Тихонова Н. В. Исследование белковых фракций вторичного продовольственного сырья // Дальневосточный аграрный вестник. 2024. Том 18. № 4. С. 113–119. <https://doi.org/10.22450/1999-6837-2024-18-4-113-119>.

Original article

Study of protein fractions of secondary food raw materials

Sergey L. Tikhonov¹, Natalya V. Tikhonova²

¹ Ural State Forestry University, Sverdlovsk region, Ekaterinburg, Russian Federation

^{1,2} Ural State Agrarian University, Sverdlovsk region, Ekaterinburg, Russian Federation

¹ tihonov75@bk.ru

Abstract. Peptides isolated from fish protein hydrolysates can be used in food systems as functional ingredients of specialized food products. A study was conducted to determine the fractional composition and amino acid sequence of the protein of the pink salmon innards. The crushed innards of chilled pink salmon were used as an object of research. Extraction methods based on the use of ammonium sulfate were used to isolate proteins. The amino acid sequence in a peptide was

determined by mass spectrometric method. Two protein fractions were isolated in the chilled pink salmon innards. The amino acid sequence of fraction 1 was 194 amino acids, and fraction 2 was 134 amino acids. The sequences contain certain repetitive amino acid motifs, in particular CC, EE, YY, VV, PP, AA, LL, NM, PPE, CYR and others, indicating the presence of structural or functional areas in the protein composition that may have significant biological effects with target cells. For further isolation and identification of biologically active peptides from amino acid sequences of protein fractions, it is advisable to carry out a predetermined prediction of protein hydrolysis (*in silico*) followed by peptidomic analysis based on mass spectrometry. It will allow monitoring the content of already known peptides in fractions, but at the same time using it as a tool for the discovery of new bioactive peptides.

Keywords: protein fractions, peptides, secondary food raw materials, amino acid sequence, predetermined prediction of protein hydrolysis

For citation: Tikhonov S. L., Tikhonova N. V. Study of protein fractions of secondary food raw materials. *Dal'nевосточный аграрный вестник*. 2024;18:4:113–119. (in Russ.). <https://doi.org/10.22450/1999-6837-2024-18-4-113-119>.

Введение. Одним из перспективных направлений развития пищевой науки является выделение новых биологически активных веществ из продовольственного сырья и побочных продуктов его переработки, в частности рыбы.

В настоящее время большая часть всего производимого рыбного сырья выбрасывается или перерабатывается в рыбную муку. При переработке рыбы и других водных объектов образуется большой объем побочных продуктов и отходов с более высоким уровнем химической и биологической потребности в кислороде, которые, вероятно, окажут негативное воздействие на прибрежные и морские экосистемы [1].

Значительное количество отходов рыбопереработки, образующихся в перерабатывающих отраслях, приводит к более высоким затратам на утилизацию при значительном снижении экономической отдачи. Использование рыбных субпродуктов является важной производственной задачей для рыбной промышленности и предприятий по переработке морепродуктов, поскольку это может принести дополнительную прибыль, а также снизить затраты на утилизацию [2].

Одной из потенциальных возможностей получения большей выгоды является использование данных промышленных отходов и малоценней рыбы для извлечения и гидролиза белков, богатых биологически активными пептидами [3].

Многие биологически активные пептиды с ценными питательными и функциональными свойствами содержатся в гидролизатах, полученных в резуль-

тате ферментативного гидролиза рыбных белков [4]. Вторичное сырье, получаемое из водных источников, может быть переработано с использованием ферментативного гидролиза с целью извлечения биологически активных веществ [5].

Продукты переработки рыбы являются доступным и дешевым сырьем для производства протеолитических ферментных препаратов [6].

Гидролитический распад высокомолекулярных белков до низкомолекулярных белков (пептидов) является основой производства белковых гидролизатов с биопептидами [7]. Используя различные ферменты, разную рыбу в качестве субстратов и переменные протеолитические факторы, такие как кислотность, температура, соотношение фермента к субстрату и время, можно получить широкий спектр гидролизатов с различными физическими, химическими и биологическими характеристиками [8].

Пептиды, выделенные из гидролизатов рыбного белка, могут использоваться в пищевых системах в качестве функциональных ингредиентов специализированной пищевой продукции. Вопросам производства продуктов питания специализированного и функционального назначения посвящены работы [9–11].

В этой связи целесообразно исследовать белки вторичного рыбного сырья на возможность их дальнейшего использования в качестве сырья для получения пептидов.

Цель исследований – определение фракционного состава и аминокислотной

последовательности белка внутренностей горбуши (*Oncorhynchus gorbuscha*).

Методы исследований. В качестве объекта исследований использовали измельченные внутренности охлажденной горбуши.

Для выделения белков были применены методы высыпивания с сульфатом аммония. Предварительно проведено измельчение исходного сырья, после чего выполнялось выделение белка путем экстракции в присутствии 3-процентного раствора хлорида натрия. Затем растворы белков обрабатывались ультразвуковым диспергатором и растворялись в дистиллированной воде.

Далее к раствору добавлялся сульфат аммония до достижения насыщения раствора на 80 %. Полученные образцы выдерживались при комнатной температуре в течение 24 часов. Собранные белки отделялись центрифугированием со скоростью ротора 8 000 оборотов в минуту в течение 15 минут.

После этого проводилось ресуспензирование белков в фосфатном буфере с pH 6,8. Для дополнительной очистки от солей использовался метод диализа с отсечкой по массе 10 кДа.

Последовательность аминокислот в пептиде устанавливалась масс-спектрометрическим методом.

Результаты исследований и их обсуждение. На рисунке 1 представлен фракционный состав белка внутренностей горбуши. Из представленных данных следует, что во внутренностях охлажденной горбуши выделены две белковые фракции, которым даны условные названия: *фракция 1* и *фракция 2*.

На рисунке 2 приведены масс-спектры белковых фракций внутренностей охлажденной горбуши.

В таблице 1 показаны характеристики (аминокислотная последовательность и молекулярная масса) белковых фракций внутренностей охлажденной горбуши.

Аминокислотную последовательность фракции 1 составляет 194 аминокислоты, фракции 2 – 134 аминокислоты. В последовательностях находятся определенные повторяющиеся аминокислотные мотивы, в частности CC, EE, YY, VV, PP, AA, LL, NM, PPE, CYR и другие, указывающие на наличие структурных или функциональных областей в составе белка, которые могут иметь значимое биологическое действие на клетки-мишени.

Для дальнейшего выделения и идентификации биологически активных пептидов из аминокислотных последовательностей белковых фракций 1 и 2 целесообразно провести заданное прогнозирование гидролиза белка (*in silico*) с последующим

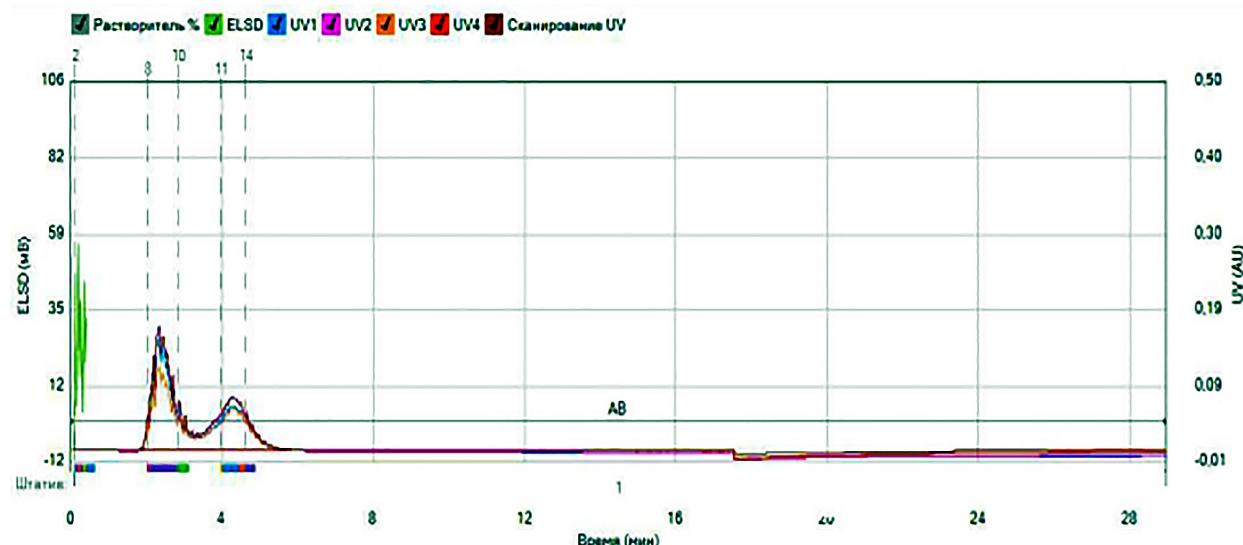
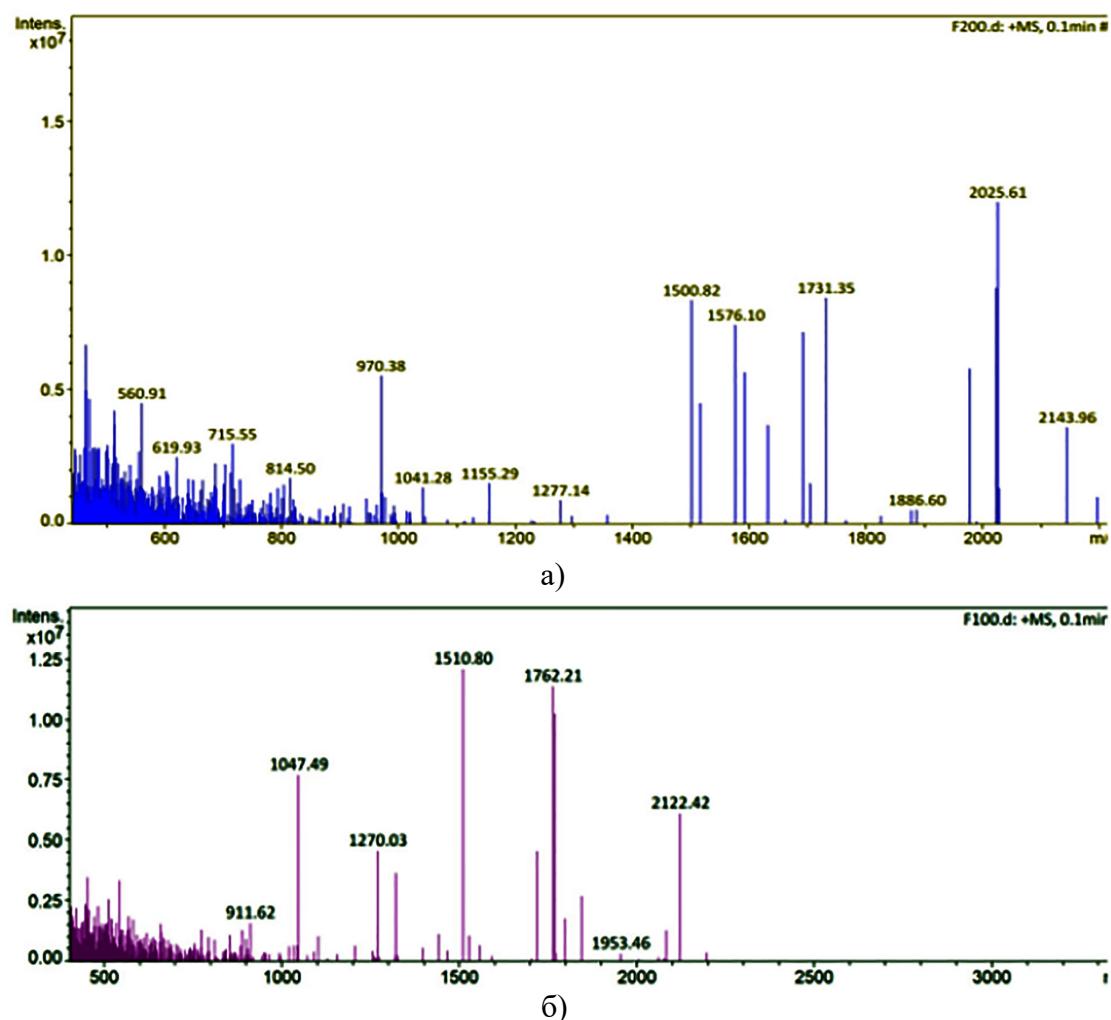


Рисунок 1 – Фракционный состав белка внутренностей охлажденной горбуши
Figure 1 – Fractional composition of protein in the chilled pink salmon innards



а) фракция 1 (fraction 1); б) фракция 2 (fraction 2)

Рисунок 2 – Масс-спектры белковых фракций внутренностей охлажденной горбуши

Figure 2 – Mass spectra of protein fractions of the chilled pink salmon innards

Таблица 1 – Характеристика (аминокислотная последовательность и молекулярная масса) белковых фракций внутренностей охлажденной горбуши

Table 1 – Characteristics (amino acid sequence and molecular weight) of protein fractions of the chilled pink salmon innards

Наименование белковой фракции	Аминокислотная последовательность	Молекулярная масса, кДа
Фракция 1	TCCEEQEKANCFQTKAEPFIYYLKYDGC CEGDVVQCIRGECIYNSKDLLKECCNM ENPPECYRECCNMENPPECYRHAENRSL KIVQRLAAKSQAATCCEEQEKANCFQTK AEPFIYYLKYDGCCEGDDVQCIRGECIY SNKDLLKECCNMENPPECYRECCNMEN PPECYRHAENRSLKIVQRLAAKSQAA	2,12
Фракция 2	HFSKAKTLDANQEITDLESKTEDLDLPE ENQASEDYRTAKRPLEREGMVSIMSFR NSDYQPVKLQGTLPVEARGNPPYRGNP PIYRFWKGDLYHYKMSDKISTSEEVCSF HLKIETRAGEAAAERDAEITFIK	2,20

пептидомическим анализом, основанным на масс-спектрометрии, который является чувствительным инструментом для систематического картирования пептидного пространства (пептидома).

Прогнозирование гидролиза позволяет из неактивных белков-предшественников (фракции 1 и 2) получить более короткие активные формы (пептиды), а также множество неактивных продуктов распада белка и свободные аминокислоты. Применение пептидомического анализа на основе масс-спектрометрии фракций 1 и 2 позволит провести мониторинг содержания уже известных пептидов в данных фракциях. В тоже время использование его в качестве инструмента для обнаружения новых биоактивных пептидов представляет собой серьезную проблему типа «иголка в стогу сена», заключающуюся в отделении небольшого набора реальных биоактивных пептидов от обширного фона наблюдаемых продуктов распада и неактивных предшественников, так как

количество уникальных пептидных последовательностей превышает возможности функционального тестирования. Следовательно, для продвижения в области открытия пептидов необходимо использовать прогнозируемый гидролиз.

Заключение. В результате исследований в побочных продуктах переработки рыбы выделены две белковые фракции, имеющие повторяющиеся последовательности аминокислот, что возможно свидетельствует о их биологической активности. Чтобы расширить возможности по идентификации потенциальных биоактивных пептидов в исследуемых белковых фракциях следует провести прогнозирование биоактивности (*in silico*) аминокислотного состава, что позволит идентифицировать известные и выделить ряд новых биопептидов. Использование модели скрининга пептидов позволит сократить количество тестов по определению и подтверждению их биоактивности в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

Список источников

1. Islam M. S., Khan S., Tanaka M. Waste loading in shrimp and fish processing effluents: potential source of hazards to the coastal and nearshore environments // The Marine Pollution Bulletin. 2004. Vol. 49. No. 1–2. P. 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.01.018>.
2. Arvanitoyannis I. S., Kassaveti A. Fish industry waste: treatments, environmental impacts, current and potential uses // International Journal of Food Science and Technology. 2008. Vol. 43. P. 726–745. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.01513.x>.
3. He S., Franco C., Zhang W. Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP) // Journal Food Research International. 2013. Vol. 50. No. 1. P. 289–297. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.10.031>.
4. Ghaly A. E., Ramakrishnan V. V., Brooks M. S., Budge S. M., Dave D. Fish processing wastes as a potential source of proteins: amino acids oils a critical review // Journal of Microbial and Biochemical Technology. 2013. Vol. 5. No. 4. P. 107–129. <http://dx.doi.org/10.4172/1948-5948.1000110>.
5. Mutalipassi M., Esposito R., Ruocco N., Viel T., Costantini M., Zupo V. Bioactive compounds of nutraceutical value from fishery and aquaculture Discards // Foods. 2021. Vol. 10. No. 7. P. 1495. <https://doi.org/10.3390/foods10071495>.
6. Chanalia P., Gandhi D., Attri P., Dhanda S. Extraction, purification and characterization of low molecular weight Proline iminopeptidase from probiotic *L. plantarum* for meat tenderization // International Journal of Biological Macromolecules. 2018. Vol. 109. P. 651–663. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.092>.
7. Shirai K., Ramírez-Ramírez J. C. Utilization of fish processing by-products for bioactive compounds // Hall G. M. (Eds.). Fish processing – Sustainability and New Opportunities. Blackwell Publishing Ltd., 2011. 236 p.
8. 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. P. 43–81. <https://doi.org/10.1080/10408690091189266>.
9. Гапонова Л. В., Логинова Т. Т., Першикова А. В., Решетник Е. И. Соя в лечебно-профилактическом и детском питании // Молочная промышленность. 1999. № 5. С. 25–27. EDN NVBNEP.

10. Miftahutdinova E. A., Tikhonov S. L., Tikhonova N. V. Development of lithium-containing feed additive and its use for fortification of chicken broilers meat and by-products // Theory and Practice of Meat Processing. 2020. Vol. 5. No. 1. P. 27–31. <https://doi.org/10.21323/2414-438X-2020-5-1-27-31>.
11. Liang Zh., Yi M., Sun J., Zhang T., Wen R., Li Ch., Reshetnik E. I., Gribanova S. L. [et al.]. Physicochemical properties and volatile profile of mung bean flour fermented by *Lacticaseibacillus casei* and *Lactococcus lactis* // Food Science and Technology. 2022. Vol. 163. P. 113565. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113565>.

References

1. Islam M. S., Khan S., Tanaka M. Waste loading in shrimp and fish processing effluents: potential source of hazards to the coastal and nearshore environments. The Marine Pollution Bulletin, 2004;49:1–2:103–110. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.01.018>.
2. Arvanitoyannis I. S., Kassaveti A. Fish industry waste: treatments, environmental impacts, current and potential uses. International Journal of Food Science and Technology, 2008;43:726–745. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.01513.x>.
3. He S., Franco C., Zhang W. Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP). Journal Food Research International, 2013;50:1:289–297. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.10.031>.
4. Ghaly A. E., Ramakrishnan V. V., Brooks M. S., Budge S. M., Dave D. Fish processing wastes as a potential source of proteins: amino acids oils a critical review. Journal of Microbial and Biochemical Technology, 2013;5:4:107–129. <http://dx.doi.org/10.4172/1948-5948.1000110>.
5. Mutalipassi M., Esposito R., Ruocco N., Viel T., Costantini M., Zupo V. Bioactive compounds of nutraceutical value from fishery and aquaculture Discards. Foods, 2021;10:7:1495. <https://doi.org/10.3390/foods10071495>.
6. Chanalia P., Gandhi D., Attri P., Dhanda S. Extraction, purification and characterization of low molecular weight Proline iminopeptidase from probiotic *L. plantarum* for meat tenderization. International Journal of Biological Macromolecules, 2018;109:651–663. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.092>.
7. Shirai K., Ramírez-Ramírez J. C. Utilization of fish processing by-products for bioactive compounds. In.: Hall G. M. (Eds.). Fish processing – Sustainability and New Opportunities, Blackwell Publishing Ltd., 2011, 236 p.
8. Kristinsson H. G., Rasco B. A. Fish protein hydrolysates: production, biochemical and functional properties. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2000;40:1:43–81. <https://doi.org/10.1080/10408690091189266>.
9. Gaponova L. V., Loginova T. T., Pershikova A. V., Reshetnik E. I. Soybean in medical and preventive and children's nutrition. *Molochnaya promyshlennost'*, 1999;5:25–27. EDN NVBNEP (in Russ.).
10. Miftahutdinova E. A., Tikhonov S. L., Tikhonova N. V. Development of lithium-containing feed additive and its use for fortification of chicken broilers meat and by-products. Theory and Practice of Meat Processing, 2020;5:1:27–31. <https://doi.org/10.21323/2414-438X-2020-5-1-27-31>.
11. Liang Zh., Yi M., Sun J., Zhang T., Wen R., Li Ch., Reshetnik E. I., Gribanova S. L. [et al.]. Physicochemical properties and volatile profile of mung bean flour fermented by *Lacticaseibacillus casei* and *Lactococcus lactis*. Food Science and Technology, 2022;163:113565. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113565>.

© Тихонов С. Л., Тихонова Н. В., 2024

Статья поступила в редакцию 25.10.2024; одобрена после рецензирования 16.11.2024; принята к публикации 22.11.2024.

The article was submitted 25.10.2024; approved after reviewing 16.11.2024; accepted for publication 22.11.2024.

Информация об авторах

Тихонов Сергей Леонидович, доктор технических наук, профессор кафедры химической технологии древесины, биотехнологии и наноматериалов, Уральский государственный лесотехнический университет; профессор кафедры пищевой инженерии и аграрного производства, Уральский государственный аграрный университет, tihonov75@bk.ru;

Тихонова Наталья Валерьевна, доктор технических наук, профессор, заведующая кафедрой пищевой инженерии и аграрного производства, Уральский государственный аграрный университет

Information about the authors

Sergey L. Tikhonov, Doctor of Technical Sciences, Professor of the Department of Chemical Technology of Wood, Biotechnology and Nanomaterials, Ural State Forestry University; Professor of the Department of Food Engineering and Agricultural Production, Ural State Agrarian University, tihonov75@bk.ru;

Natalya V. Tikhonova, Doctor of Technical Sciences, Professor, Head of the Department of Food Engineering and Agricultural Production, Ural State Agrarian University

Вклад авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.
Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Contribution of the authors: the authors contributed equally to this article.
The authors declare no conflicts of interests.