

УДК (664.97:593.92):636.087

**Е.В. Шадрина, С.Н. Максимова, Е.М. Панчишина, В.Д. Богданов,
Н.Г. Тунгусов***

Дальневосточный государственный технический
рыбохозяйственный университет,
690087, г. Владивосток, ул. Луговая, 526

ОБОСНОВАНИЕ УСЛОВИЙ БИОМОДИФИКАЦИИ МОРСКИХ ЗВЕЗД ПРИ ПОЛУЧЕНИИ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ

Обосновано применение биотехнологического воздействия в технологии кормовых продуктов из морских звезд (использованы морские звезды *Evasterias echinosoma* и *Patiria pectinifera*, выловленных в разные периоды времени в бухте Северной Хасанского района Приморского края). Обоснованы технологические параметры ферментативного гидролиза морских звезд, позволяющие получить кормовую добавку высокой биологической ценности. Использование гидролиза в технологии кормовой добавки позволяет животным и птицам получать питательные вещества в более доступной форме. В эксперименте исследованы следующие переменные факторы, характеризующие эффективность ферментативного гидролиза: концентрация ферментного препарата, температура, рН среды, продолжительность гидролиза, гидромодуль и их влияние на эффективность ферментации. Показана зависимость количества накопленного аминокислотного азота и степени гидролиза от названных параметров. Установлены рациональные параметры ферментативной обработки морских звезд при получении биологически ценной кормовой добавки: концентрация ферментативного препарата «Коллагеназа» — 0,25–1,0 %; продолжительность процесса — 2–4 ч; температура — 45–55 °С; рН — 6,0; гидромодуль — 0,4.

Ключевые слова: морские звезды, технология, режимы, ферментативный гидролиз, «Коллагеназа», кормовая добавка.

Shadrina E.V., Maximova S.N., Panchishina E.M., Bogdanov V.D., Tungusov N.G.
Substantiation of conditions for biomodification of starfish for production of fodder additives // Izv. TINRO. — 2016. — Vol. 187. — P. 261–266.

Biotechnological stage in technology of fodder products of starfish is substantiated. The starfishes *Evasterias echinosoma* and *Patiria pectinifera* caught in the Severnaya Bay (Primorye coast of the Japan Sea) are used in the experiments on enzymic hydrolysis for production of the fodder additive with high biological value. The hydrolysis provides the more accessible forms of nutrients for animals and birds. Impacts of the enzyme preparation concentration, temperature,

* Шадрина Екатерина Васильевна, аспирант, e-mail: katyashadrina83@mail.ru; Максимова Светлана Николаевна, доктор технических наук, профессор, заведующая кафедрой, e-mail: maxsvet61@mail.ru; Панчишина Екатерина Мироновна, кандидат технических наук, заведующая лабораторией, e-mail: ekaterina.pan.8@mail.ru; Богданов Валерий Дмитриевич, доктор технических наук, профессор, e-mail: bogdanovvd@dgtru.ru; Тунгусов Николай Гаврилович, кандидат технических наук, доцент, e-mail: tungusovn@mail.ru.

Shadrina Ekatherina V., post-graduate student, e-mail: katyashadrina83@mail.ru; Maximova Svetlana N., D.Sc., professor, head of department, e-mail: maxsvet61@mail.ru; Panchishina Ekatherina M., Ph.D., head of laboratory, e-mail: ekaterina.pan.8@mail.ru; Bogdanov Valery D., D.Sc., professor, e-mail: bogdanovvd@dgtru.ru; Tungusov Nickolay G., Ph.D., senior lecturer, e-mail: tungusovn@mail.ru.

pH, time of hydrolysis, and water duty on efficiency of enzymic hydrolysis are tested in the experiments; these parameters influence on the amount of accumulated amino nitrogen and on the hydrolysis degree is evaluated. The following rational values are determined for the parameters in the process of protein-mineral fodder additive production: concentration of enzyme collagenase preparation — 0.25–1.00 %; time of treatment — 2–4 hours; temperature — 45–55 °C; pH — 6.0; water duty — 0.2.

Key words: starfish, technology, mode of hydrolysis, enzymic hydrolysis, Collagenase, fodder additive.

Введение

Разработка рациональных технологий кормовых продуктов, особенно из водных биологических ресурсов, является важным фактором увеличения степени их использования.

В результате проведенных нами ранее экспериментальных работ (Богданов и др., 2015) установлена целесообразность получения кормовой добавки из морских звезд *Evasterias echinosoma* и *Patiria pectinifera*, выловленных в разные периоды времени в бухте Северной Хасанского района Приморского края. Обоснованные способы получения кормовых продуктов с использованием метода прямой сушки имеют ряд недостатков, связанных с биологическими особенностями морских звезд. Высокое содержание минеральных веществ и наличие коллагена в составе мышечной ткани морских звезд предопределило целесообразность разработки биотехнологического воздействия при обработке данного сырья.

Цель настоящих исследований состояла в обосновании рациональных технологических режимов ферментативного гидролиза при производстве кормовой добавки из морских звезд.

Материалы и методы

В экспериментальной работе использовали все части тела морских звезд *E. echinosoma* и *P. pectinifera* (высокоминерализованную покровную ткань и внутренние органы, составляющие от 5 до 22 % массы), выловленных в бухте Северной Хасанского района Приморского края.

Ферментализ осуществляли в термостате при температурах 35–55 °C.

Применяли ферментный препарат «Коллагеназа» (протеолитическая активность — 164,3 ПЕ/г), который предварительно растворили в воде. Протеолитическая активность фермента, установленная экспериментальным путем, несколько отличается от исходной и составляет 165 ПЕ/г.

В исследованиях использовали следующие переменные параметры: концентрация ферментного препарата, температура, pH среды, продолжительность гидролиза, гидро-модуль, — определяя их влияние на эффективность гидролиза, которую оценивали по количеству накопленного аминного азота и степени (глубины) гидролиза.

В условиях эксперимента использовали ферментный препарат с концентрацией в диапазоне 0,25; 0,50; 0,75; 1,0 %.

Продолжительность ферментативной обработки составила 5 ч, поскольку для большинства белков зависимость степени расщепления белоксодержащего сырья от продолжительности гидролиза под действием ферментного препарата графически описывается экспонентой с приближением к насыщению к 5-му часу гидролиза (Пивненко, Ковалев, 2015).

Отбор проб для определения аминного азота осуществляли каждый час.

В работе применялись химические и биологические методы исследования.

Определение аминного азота ($N_{ам}$, %) осуществляли по ГОСТ 7636, общего азота — рефрактометрическим методом. Степень гидролиза рассчитывали как отношение аминного и общего азота, выраженное в процентах (Грачева и др., 1982).

Для оценки относительной биологической ценности (ОБЦ) кормовой продукции использовали инфузорию *Tetrahymena pyriformis*. На питательной среде клетки простейших фиксировали путем внесения в пробирку с культурой фиксирующего вещества (на

1 мл среды каплю 5 %-ного спиртового раствора йода) и производили их подсчет. Подсчет клеток простейших производили в счетных камерах Фукса-Розенталя. Показатель ОБЦ определяли отношением числа клеток инфузорий, выросших на опытном продукте, к количеству инфузорий, выросших на контрольной среде, выраженным в процентах:

$$\text{ОБЦ} = \frac{N_o}{N_k} \cdot 100,$$

где N_o — число инфузорий, выросших в 1 мл на среде с опытным продуктом, N_k — число инфузорий, выросших в 1 мл на среде с контролем (Шульгин и др., 2006).

Результаты и их обсуждение

Влияние концентрации ферментного препарата и продолжительности гидролиза на накопление аминного азота представлено в табл. 1.

Таблица 1
Количество аминного азота в зависимости от концентрации ферментного препарата «Коллагеназа» и продолжительности гидролиза (гидромодуль — 0,4), %

Table 1

Accumulated amount of amine nitrogen (%) in dependence on concentration of enzyme collagenase and time of hydrolysis (under water duty 0.4)

Продолжительность, ч	Концентрация ферментного препарата, %			
	0,25	0,50	0,75	1,0
1	0,13	0,23	0,25	0,22
2	0,25	0,29	0,30	0,36
3	0,34	0,40	0,42	0,46
4	0,39	0,49	0,50	0,56
5	0,53	0,56	0,56	0,63

Зависимость степени гидролиза от концентрации фермента и продолжительности гидролиза выражена графически и представлена на рис. 1.

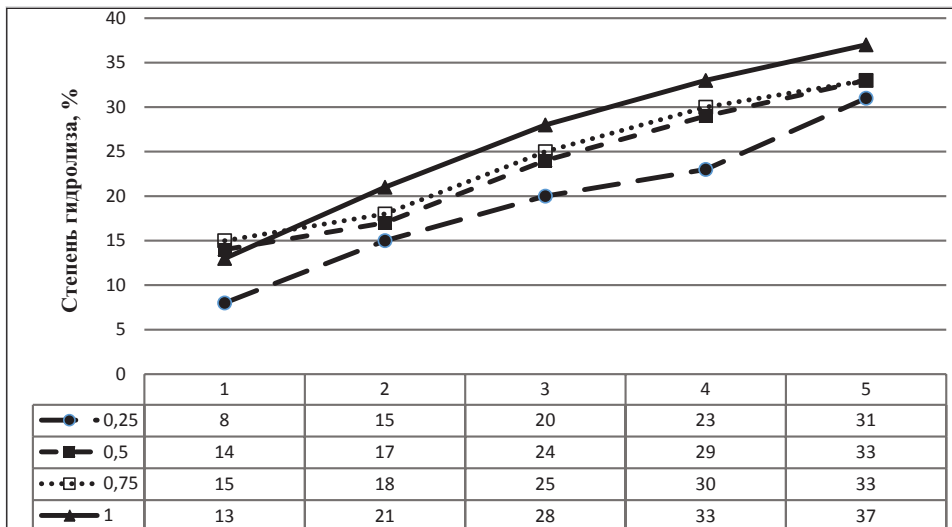


Рис. 1. Зависимость степени гидролиза от продолжительности ферментативной обработки и концентрации ферментного препарата «Коллагеназа»

Fig. 1. Dependence of the hydrolysis degree on time of enzymic treatment and concentration of the enzyme preparation Collagenase

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что в пределах концентраций фермента от 0,25 до 1,0 % в течение 5 ч достигается степень гидролиза в одном диапазоне, средняя величина которого составляет 34 %. Данная величина может быть получена при сокращении продолжительности ферментализации до 4 ч. В связи с этим можно принять как рациональную продолжительность гидролиза 4 ч.

Влияние температуры на ферментативный гидролиз обусловлено двумя основными процессами. С одной стороны, при повышении температуры скорость гидролиза, как и любой химической реакции, возрастает, с другой — за счет денатурации молекулы фермента падает его активность, что приводит к снижению скорости процесса (Пивненко, Ковалев, 2015).

В условиях данного эксперимента использовали концентрацию фермента 1 %, продолжительность гидролиза 4 ч, обработку проводили при температурном диапазоне 35; 45 и 55 °С.

Результаты по определению влияния температуры процесса гидролиза на количество аминного азота представлены в табл. 2.

Таблица 2

Количество аминного азота в зависимости от температуры процесса гидролиза, %

Table 2

Accumulated amount of amine nitrogen (%) in dependence on temperature of the hydrolysis process

Продолжительность, ч	Температура, °С		
	35	45	55
1	0,22	0,31	0,40
2	0,36	0,77	0,91
3	0,46	0,96	1,05
4	0,56	1,03	1,31

Зависимость степени гидролиза от температуры процесса во времени представлена графически на рис. 2.

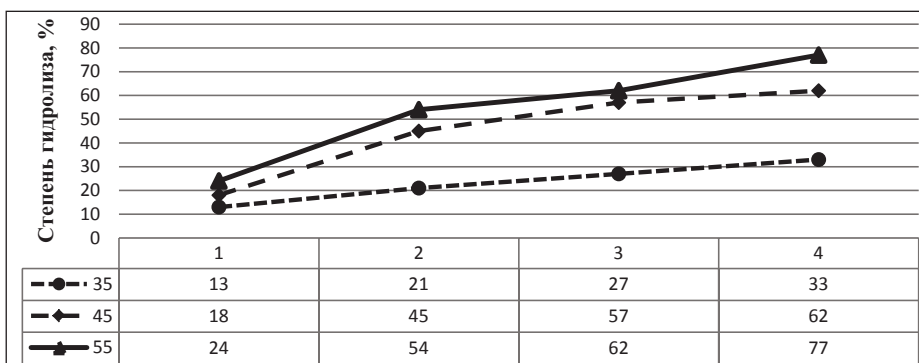


Рис. 2. Зависимость степени гидролиза от температуры процесса

Fig. 2. Dependence of the hydrolysis degree on temperature of the process

Как видно на рис. 2, степень гидролиза при максимальной продолжительности процесса (4 ч) составляла от 33 до 77 %. При этом при продолжительности гидролиза 2 ч, температуре 55 °С и концентрации фермента 1 % достигается степень гидролиза, имеющая величину, близкую к среднему значению от указанного диапазона — 54 %.

Из полученных данных следует, что температура реакционной среды значительно влияет на степень гидролиза. Так, через 4 ч ферментативной обработки при температуре 45 и 55 °С степень гидролиза в данных условиях достигала высоких значений и составила соответственно 62 и 77 %. Вероятно, что при дальнейшей экспозиции значение степени гидролиза достигнет экстремума.

Известно, что гидромодуль (соотношение сырья и воды) определяет концентрацию белка и фермента в растворе и их взаимодействие. При разбавлении субстрата усиливаются растворение и диффузия, что облегчает фермент-субстратное взаимодействие. С другой стороны, уменьшение концентрации белка способствует снижению стабильности фермента (денатурации) в процессе гидролиза. С течением времени процессы денатурации усиливаются, соответственно чем больше степень разбавления, тем сильнее процессы денатурации во времени. Как и все другие параметры гидролиза,

величина гидромодуля будет индивидуальна для каждого процесса и должна быть подобрана опытным путем. Следует учитывать, что чем больше значение гидромодуля, тем более разбавленным будет гидролизат (Пивненко, Ковалев, 2015).

В данном исследовании использовали концентрацию фермента 1,0 %, температурный режим 55 °С, продолжительность гидролиза 2 ч, диапазон гидромодуля 1,0; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2.

Результаты по определению зависимости эффективности гидролиза (накопление аминного азота и степень гидролиза) от гидромодуля реакционной смеси представлены в табл. 3.

Таблица 3

Эффективность гидролиза в зависимости от гидромодуля реакционной смеси (температура — 55 °С, продолжительность гидролиза — 2 ч, концентрация фермента — 1,0 %) Table 3

Efficiency of hydrolysis in dependence on water duty of the reaction mixture (under temperature 55 °С, time of hydrolysis 2 h, concentration of enzyme 1.0 %)

Показатель	Гидромодуль				
	1,0	0,8	0,6	0,4	0,2
N _{ам} , %	1,19	1,33	1,40	1,61	0,91
Степень гидролиза, %	70,0	78,0	82,0	95,0	54,0

Установлено, что с уменьшением гидромодуля до 0,4 степень гидролиза увеличивается до 95 %, т.е. уменьшение разбавления субстрата облегчает фермент-субстратное взаимодействие. Вероятно, это связано с высоким содержанием воды в сырье.

На основании полученных результатов рациональным гидромодулем является 0,4. При таких условиях достигается максимальная величина степени гидролиза — 95 %.

Большинство ферментов характерным образом изменяет свою активность в зависимости от pH. Для различных протеолитических ферментов значения pH-оптимума колеблются в широких пределах от сильно кислой среды для пепсина до умеренно щелочной для сериновых протеиназ.

Коллагенолитические протеазы из гепатопанкреаса краба проявляют максимальную активность в интервале pH от 6 до 9 (Пивненко, Ковалев, 2015).

Следует отметить, что полученный гидролизат имел pH, равную 6.

В данном исследовании использовали концентрацию фермента 1,0 % при температурном режиме 55 °С и гидромодуле 0,4.

Результаты по накоплению аминного азота в зависимости от pH представлены в табл. 4.

Таблица 4

Количество аминного азота (единицы) в зависимости от pH (температура — 55 °С, гидромодуль — 0,4, концентрация фермента — 1,0 %) Table 4

Amount of amine nitrogen (units) in dependence on pH of the hydrolysis process (under temperature 55 °С, water duty 0.4, concentration of enzyme 1.0 %)

Продолжительность, ч	Значение pH		
	6,0	8,0	9,0
2	0,91	0,67	0,66
4	1,05	0,84	0,77

Зависимость степени гидролиза от значения pH выражена графически и представлена на рис. 3.

Из полученных данных следует, что изменение pH в щелочную сторону способствует снижению активности ферментного препарата, тем самым уменьшая степень гидролитического распада белка.

Для выбора рациональных параметров гидролиза морских звезд исследовали влияние степени гидролиза на относительную биологическую ценность полученных образцов кормовой добавки (Шульгин и др., 2006).

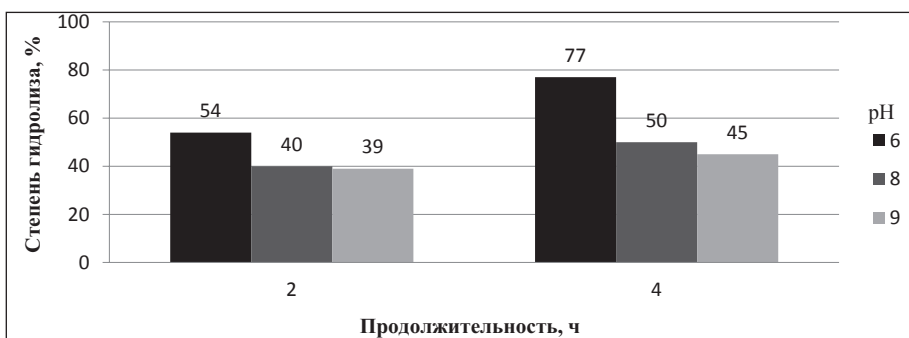


Рис. 3. Зависимость степени гидролиза от показателя pH
 Fig. 3. Dependence of the hydrolysis degree on pH of the hydrolysis process

С этой целью использовали полученные в ходе экспериментальных исследований гидролизаты, характеризующиеся степенью гидролиза 31; 37; 62; 77; 95 %.

Для дальнейших исследований полученные образцы гидролизатов для инактивации фермента подвергали прогреванию в течение 15 мин при температуре 80 °С, затем высушиванию при температуре 55 °С до содержания воды не более 10 %.

Полученные данные по сравнительной относительной биологической ценности гидролизатов с различной степенью гидролиза свидетельствуют об одинаковой выживаемости тестовой культуры. Степень гидролиза незначительно влияет на ОБЦ. При увеличении степени гидролиза наблюдается незначительное снижение биологической ценности кормовой продукции. Данный факт необходимо учитывать при обосновании рациональных режимов ферментативной обработки в технологии кормовой добавки из морских звезд.

Заключение

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что ферментативную обработку морских звезд при получении кормовой добавки рационально проводить до достижения степени гидролиза не более 31 %, варьируя параметры в следующих исследованных диапазонах: концентрация ферментативного препарата «Коллагеназа» — от 0,25 до 1,0 %; продолжительность — 2–4 ч; температура — 45–55 °С; pH — 6,0; гидромодуль — 0,4.

Результаты экспериментальных исследований подтверждают целесообразность применения биотехнологического воздействия на морские звезды при разработке технологии кормовой добавки. Обоснованные рациональные технологические параметры ферментативного гидролиза позволят получить готовый кормовой продукт с высокими показателями биологической ценности.

Список литературы

Богданов В.Д., Максимова С.Н., Тунгусов Н.Г., Шадрина Е.В. Технохимическая характеристика морских звезд как объекта промышленной переработки // Изв. ТИНРО. — 2015. — Т. 181. — С. 241–251.

Грачева И.М., Грачев Ю.П., Мосичев М.С. и др. Лабораторный практикум по технологии ферментных препаратов. — М. : Лег. и пищ. пром-сть, 1982. — 240 с.

Пивненко Т.Н., Ковалев Н.Н. Сериновые протеиназы морских организмов: свойства, получение, применение : моногр. — Владивосток : Дальрыбвтуз, 2015. — 400 с.

Шульгин Ю.П., Шульгина Л.В., Петров В.А. Ускоренная биотис оценка качества и безопасности сырья и продуктов из водных биоресурсов : моногр. — Владивосток : ТГЭУ, 2006. — 120 с.

Поступила в редакцию 3.10.16 г.