

УДК [664.951.014:577.15]:639.272

**Обоснование рациональных режимов
ферментативного гидролиза мяса мидий***М.В. Арнаут¹, Л.С. Абрамова^{1,2}, В.В. Гершунская¹*¹Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии (ФГБНУ «ВНИРО», г. Москва),²Российский университет дружбы народов (РУДН, г. Москва)
e-mail: protein@vniro.ru

В настоящее время кислотные гидролизаты мяса мидий широко используются в нашей стране в лечебном и профилактическом питании. Тем не менее недостаточно удовлетворительные органолептические показатели, а также полное или частичное разрушение некоторых незаменимых аминокислот (в первую очередь триптофана) определили необходимость разработки ферментативных гидролизатов из мяса мидий. Анализ научных публикаций и проведённый модельный эксперимент на коммерческом препарате «МИГИ-К ЛП» по оценке радиорезистентных свойств пептидов различных молекулярных масс определили основной показатель при создании ферментолизата мяса мидий: содержание пептидных фракций с молекулярной массой менее 3,6 кДа в ферментолизате должно составлять не менее 45%. Для установления рациональных параметров технологического процесса ферментативного гидролиза, обеспечивающих получение ферментолизата мяса мидий с заданным молекулярно-массовым распределением, анализировали зависимость выхода аминного азота и накопления сухих веществ в реакционной смеси от продолжительности процесса, концентрации ферментного препарата и концентрации мяса мидий в смеси. Благодаря использованию метода математического планирования эксперимента обоснованы рациональные режимы ферментативного гидролиза мяса мидий, обеспечивающие получение ферментолизата с заданным молекулярно-массовым распределением пептидных фракций. Установлены рациональные параметры ферментативного гидролиза мяса мидий: продолжительность процесса — 10–12 ч, концентрация ферментного препарата «Протозим» — 5–7% от массы сухих веществ и концентрация мяса мидий в смеси — 5–7% по сухим веществам. Апробация рациональных режимов ферментативного гидролиза в полупромышленных условиях подтвердила возможность получения ферментолизата мяса мидий с высокой биологической активностью, содержащего не менее 45% низкомолекулярных пептидных фракций.

Ключевые слова: ферментативный гидролиз, рациональные параметры, Протозим, ферментолизат мяса мидий.

ВВЕДЕНИЕ

Высокая пищевая ценность мяса мидий и наличие в нём ряда биологически активных соединений обуславливают перспективы использования его в производстве широкого ассортимента продуктов оздорови-

тельного действия. Как было отмечено в работе Л. Л. Лагунова [Лагунов и др., 1997], «ещё в древнейшей литературе встречаются упоминания об использовании мидий для восстановления сил раненых воинов. Это и навело на мысль о том, что гидролизаты из мидий за

счёт активации при гидролизе реакционно-способных групп белка, углеводов, липидов будут более эффективны, чем исходное сырьё». Сотрудниками ВНИРО более 50 лет назад была разработана технология пищевого гидролизата из мяса мидий, которая заключалась в кислотном гидролизе сырья с последующей нейтрализацией натриевой щёлочью [Лагунов, Рехина, 1967]. В настоящее время кислотные гидролизаты мяса мидий широко используются в нашей стране в лечебном и профилактическом питании, тем не менее недостаточно удовлетворительные органолептические показатели, а также полное или частичное разрушение некоторых незаменимых аминокислот (в первую очередь триптофана) определили необходимость разработки ферментативных гидролизатов из мяса мидий [Новикова, 2004].

В ряде наших предыдущих исследований были разработаны схемы получения ферментативных гидролизатов из мяса мидий и проведён выбор ферментного препарата [Арнаутков и др., 2011; Арнаутков, 2011; Арнаутков и др., 2012]. Анализ научных публикаций и проведённый модельный эксперимент на коммерческом препарате «МИГИ-К ЛП» по оценке радиорезистентных свойств пептидов различных молекулярных масс определили основной показатель при создании ферментолизата мяса мидий: содержание пептидных фракций с молекулярной массой менее 3,6 кДа, обладающих высокой радиозащитной и гемостимулирующей активностью, в ферментолизате должно составлять не менее 45% [Арнаутков, 2013].

Целью данной работы является обоснование рациональных параметров ферментативного гидролиза мяса мидий (с применением метода математического планирования эксперимента), обеспечивающих получение ферментолизата мяса мидий с заданным молекулярно-массовым распределением.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В качестве исходного сырья использовали варёно-мороженое мясо мидий *Mytilus chilensis* (Чили). Ферментализацию проводили с использованием ферментного препарата «Протозим» (ЕНЗИМ, Украина), полученного путём направленной ферментации селекционного штамма *Bacillus subtilis* и обладающего проте-

олитическим действием (протеолитическая активность — 490 ЕД/г). Процесс ферментализации мяса мидий контролировали путём отбора проб и определения в них содержания сухих веществ и аминного азота, которые являются количественными показателями процесса гидролиза. Содержание сухих веществ измеряли на портативном ручном рефрактометре (WSR Hand Refractometer, Япония) с измерительной шкалой до 32% с ценой деления 0,2%. Содержание аминного азота определяли методом формольного титрования по ГОСТ 7636. Качественным показателем продуктов процесса гидролиза является молекулярно-массовое распределение пептидных фракций в составе тестируемых образцов, которое оценивали методом эксклюзионной хроматографии среднего давления на колонке Superose 12 (1,6×50 см), (Pharmacia, Швеция), используя в качестве элюента 0,2М раствор NaCl + азид натрия, с детектированием фракций при длине волны 280 нм на проточном УФ-детекторе UV-1. Хроматограммы интегрировали весовым методом в диапазоне молекулярных масс от свободного до полного объёма хроматографической колонки.

Обоснование рациональных параметров ферментативного гидролиза мяса мидий проводили с применением метода математического планирования эксперимента по униформ-рототабельному плану второго порядка для двух факторов и статистической обработки экспериментальных данных с помощью программы Statistica 6.0 [Боровиков, 2003].

Для установления рациональных параметров технологического процесса ферментативного гидролиза анализировали зависимость выхода аминного азота и накопления сухих веществ в реакционной смеси от продолжительности процесса, концентрации ферментного препарата и концентрации мяса мидий в смеси. Обоснование рациональных режимов проводили в два этапа: I этап — зависимость накопления аминного азота и сухих веществ от концентрации мяса мидий в смеси и продолжительности процесса ферментализации; II этап — зависимость накопления аминного азота и сухих веществ от концентрации фермента и продолжительности процесса ферментализации.

С этой целью гомогенизированное лиофильно высушенное мясо мидий смешивали

с водой в количестве 2–20% от массы сухих веществ в смеси, нагревали до температуры 50 °С, вносили ферментный препарат «Протозим» в количестве от 2 до 10% от массы сухих веществ в смеси, интервал изменения времени процесса ферментализации составлял от 1 до 20 ч ($36–720 \cdot 10^2 \text{ с}$)

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Математическое моделирование технологического процесса ферментативного гидролиза мяса мидий проводили в соответствии с параметрами, приведёнными в таблице 1.

На основании параметров технологического процесса составлен матричный план интервалов варьирования факторов, таких как продолжительность процесса τ (10^2 с), концентрация фермента c (%) и концентрация

мяса мидий в смеси C (%), этот план приведён в таблице 2.

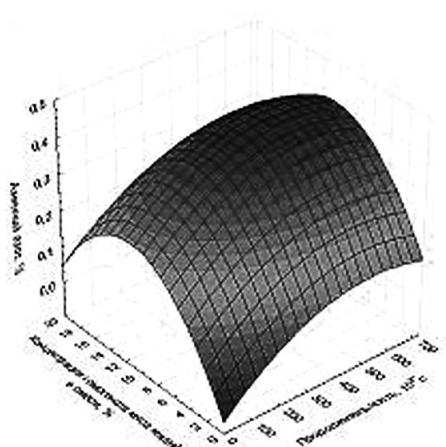
В результате реализации плана двухфакторного эксперимента и статистической обработки экспериментальных данных получено уравнение регрессии, описывающее зависимость накопления аминного азота от продолжительности процесса ферментализации и от концентрации мяса мидий в смеси (рис. 1):

$$N_1 = A(-0,0673 + 0,0008\tau' + 0,0564C' - 10,3258E - 7\tau'^2 - 6\tau'C' - 0,0025C'^2), \%,$$

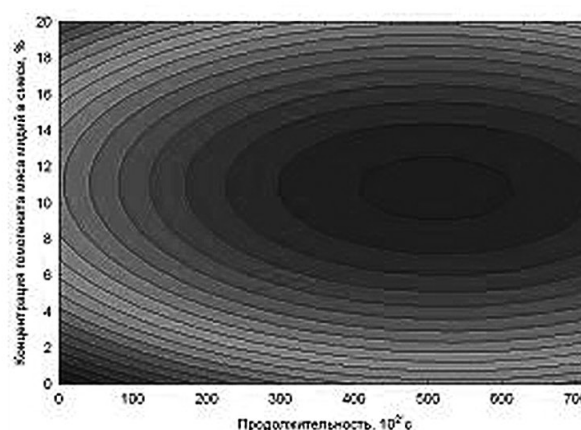
где N_1 — аминный азот, %; A — эмпирический коэффициент, имеющий размерность, %, и равный 1; τ' и C' — относительные величины; $\tau' = \tau'_{\text{ист.}} / \tau$, ($\tau = 1$), 10^2 с ; $C' = C'_{\text{ист.}} / C$, ($C = 1$), %.

Таблица 1. Характеристики технологических параметров изготовления образцов ферментативного гидролизата для математического моделирования

Технологические параметры	Размерность параметров	Интервал варьирования	Уровень варьирования		
			Нижний (–1)	Средний (0)	Верхний (+1)
Продолжительность	10^2 с	36–720	36	378	720
Концентрация фермента	%	2–10	2	6	10
Концентрация мяса мидий в смеси	%	2–20	2	11	20



а) поверхность отклика



б) изолинии её сечения

Рис. 1. Зависимость накопления аминного азота N_1 (%) от продолжительности процесса ферментализации τ (10^2 с) и от концентрации мяса мидий в смеси C (%)

Таблица 2. Интервалы варьирования факторов

Наименование факторов	В безразмерном виде		В натуральном виде	
	X1	X2	c	τ
Продолжительность и концентрация фермента	-1	-1	2	36
	-1	+1	2	720
	+1	-1	10	36
	+1	+1	10	720
	1,414	0	11,7	378
	-1,414	0	0,33	378
	0	-1,414	6	106
	0	1,414	6	862
	0	0	6	378
	0	0	6	378
Продолжительность и концентрация мяса мидий в смеси	-1	-1	2	36
	-1	+1	2	720
	+1	-1	20	36
	+1	+1	20	720
	1,414	0	0,7	378
	-1,414	0	21,3	378
	0	-1,414	11	106
	0	1,414	11	862
	0	0	11	378
	0	0	11	378

На основании анализа данного уравнения и его графической интерпретации (рис. 1) установили, что рациональные значения параметров технологического процесса, при которых происходит наибольшее накопление аминного азота следующие: продолжительность процесса 320–720 ($10^2 \cdot c$) и концентрация мяса мидий в смеси 6–12%.

В результате исследования влияния продолжительности процесса ферментации и концентрации мяса мидий в смеси на накопление сухих веществ в реакционной среде нами получено уравнение регрессии, описывающее накопление сухих веществ в течение ферментации мяса мидий при различных концентрациях мяса мидий в смеси (рис. 2):

$$R_1 = B(-0,1518 + 0,0139\tau' + 0,7232C' - 1,3602E - 5\tau' + 0,0001\tau'C' - 0,0403C'^2), \%,$$

где R_1 — выход сухих веществ, %; B — эмпирический коэффициент, имеющий размерность, %, и равный 1; τ' и C' — относительные величины; $\tau' = \tau'_{\text{ист.}} / \tau$, ($\tau = 1$), $10^2 \cdot c$; $C' = C'_{\text{ист.}} / C$, ($C = 1$), %.

Полученное уравнение и построенные по нему поверхность отклика и изолинии её сечения (рис. 2) позволили установить, что содержание сухих веществ закономерно возрастает по мере увеличения продолжительности процесса и концентрации мяса мидий в смеси, достигая наибольшего накопления сухих веществ при продолжительности процесса 350–720 ($10^2 \cdot c$) и концентрации мяса мидий в смеси 5–10%.

При определении рациональных параметров процесса ферментации по второму этапу получили уравнение регрессии, описывающее зависимость накопления аминного азота от продолжительности процесса ферментации и от концентрации ферментного препарата (рис. 3):

$$N_2 = A(-0,0252 + 0,0006\tau' + 0,0517c' - 4,1901E - 7\tau'^2 + -5\tau'c' - 0,0034c'^2), \%,$$

где N_2 — аминный азот, %; A — эмпирический коэффициент, имеющий размерность, %, и равный 1; τ' и c' — относительные величин

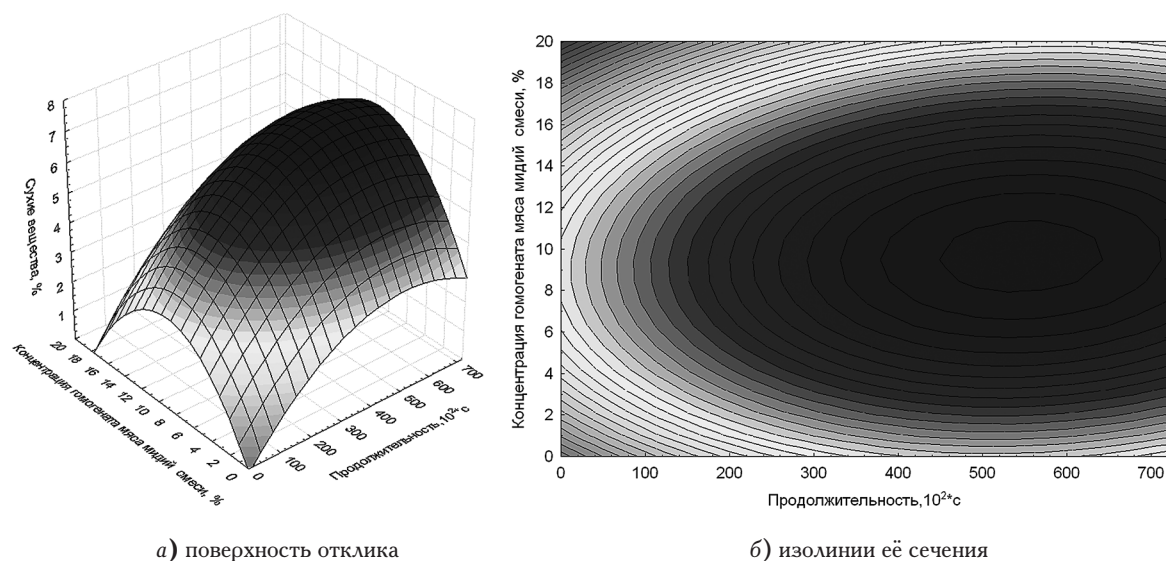


Рис. 2. Зависимость накопления сухих веществ R_1 (%) от продолжительности процесса ферментализа τ ($10^2 \cdot c$) и от концентрации мяса мидий в смеси C (%)

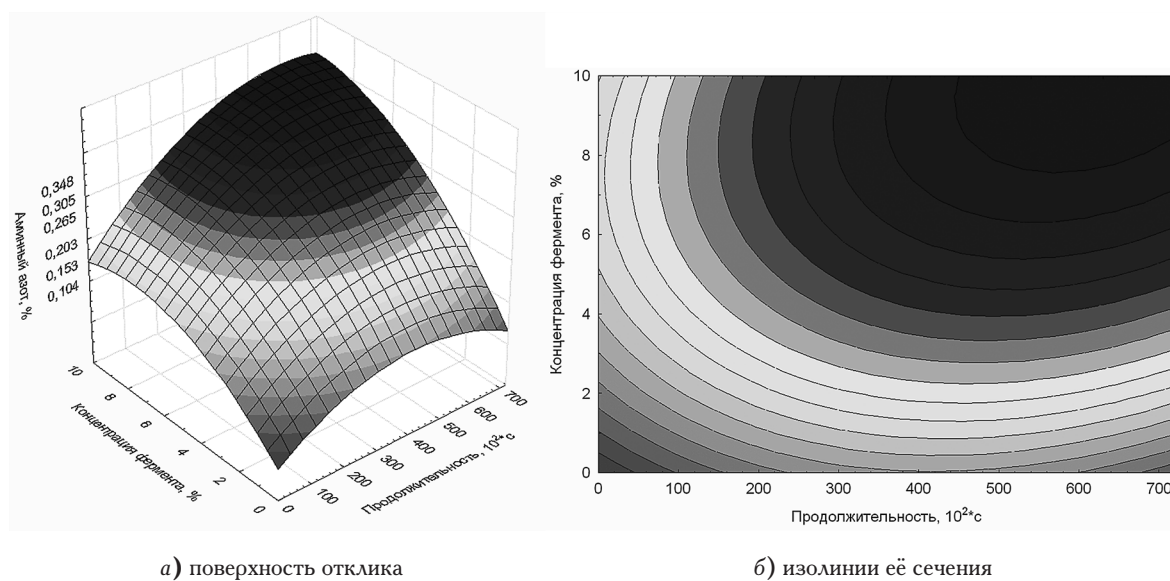


Рис. 3. Зависимость накопления аминного азота N_2 (%) от продолжительности процесса ферментализа τ ($10^2 \cdot c$) и от концентрации ферментного препарата c (%)

ны; $\tau' = \tau'_{\text{ист.}} / \tau$, ($\tau = 1$), $10^2 \cdot c$; $c' = c'_{\text{ист.}} / c$, ($c = 1$), %.

При анализе графической интерпретации данного уравнения (рис. 3) установлено, что содержание аминного азота в процессе ферментализа мяса мидий достигает наибольших значений при продолжительности процесса от 350 до 720 ($10^2 \cdot c$) и концентрации ферментного препарата от 5 до 10%.

Получено уравнение регрессии, описывающее зависимость накопления сухих веществ

от продолжительности процесса ферментализа и от концентрации ферментного препарата (рис. 4):

$$R_2 = B(0,8783 + 0,0116\tau' + 0,3659c' - 1,1081E - 5\tau'^2 + 0,0002\tau'c' - 0,0191c'^2), \%$$

где R_2' — выход сухих веществ, %; B — эмпирический коэффициент, имеющий размерность, %, и равный 1; τ' и c' — относительные величины; $\tau' = \tau'_{\text{ист.}} / \tau$, ($\tau = 1$), $10^2 \cdot c$; $c' = c'_{\text{ист.}} / c$, ($c = 1$), %.

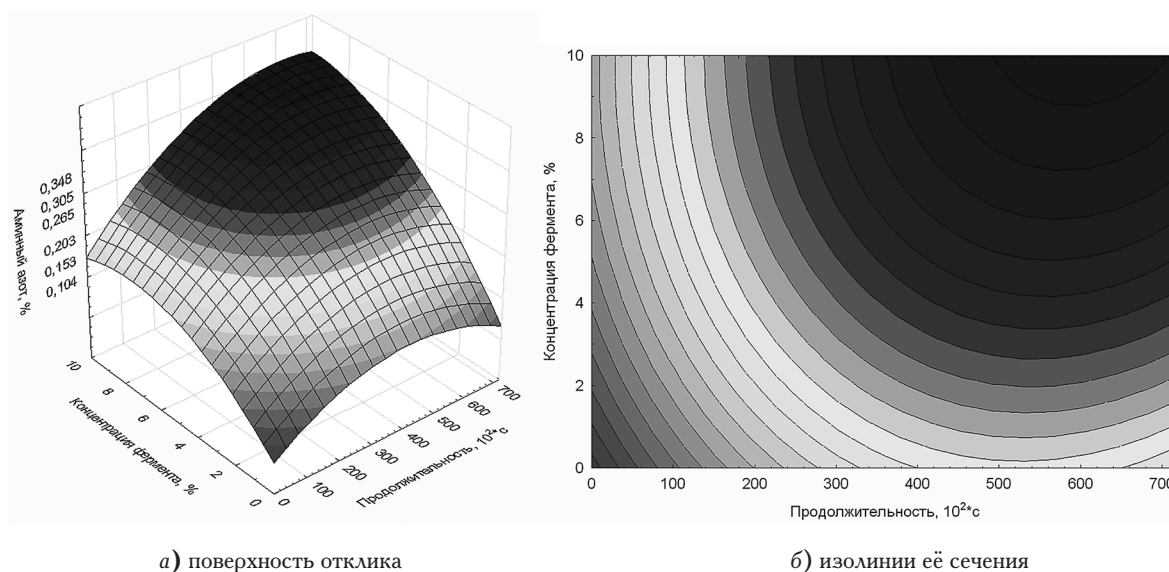


Рис. 4. Зависимость накопления сухих веществ R_2 (%) от продолжительности процесса ферментализации τ ($10^2 \cdot c$) и от концентрации ферментного препарата c (%)

Анализ построенных по уравнению зависимостей (рис. 4) показал, что наибольшее накопление сухих веществ в реакционной смеси наблюдается при продолжительности процесса 320–720 ($10^2 \cdot c$) и концентрации ферментного препарата 5–10 %.

Таким образом, в результате статистической обработки экспериментальных данных ферментативного гидролиза мяса мидий были установлены рациональные режимы технологического процесса: продолжительность процесса — 10–12 ч, концентрация ферментного препарата «Протозим» — 5–7 % от массы сухих веществ и концентрация мяса мидий в смеси — 5–7 % по сухим веществам. Аprobация технологии ферментативного гидролиза мяса мидий по установленным рациональным параметрам на опытной установке в цехе института ВНИИМС подтвердила правильность выбранных режимов. Установлено, что при дальнейшем увеличении продолжительности процесса ферментализации, концентрации ферментного препарата и концентрации мяса мидий в смеси не происходило значительного накопления аминного азота и сухих веществ.

Данные молекулярно-массового распределения пептидов ферментализата мяса мидий, полученного при продолжительности процесса 12 ч, концентрации ферментного препарата «Протозим» 5 % от массы сухих веществ

и концентрации мяса мидий в смеси 5 % по сухим веществам, представлены в таблице 3 [Арнаутков и др., 2013].

Таблица 3. Молекулярно-массовое распределение пептидных фракций ферментализата мяса мидий

№	Диапазон молекулярных масс, кДа	Содержание фракций, %
1	>70,1	2,6
2	70,1–10,4	15,4
3	10,4–3,5	33,5
4	<3,5	48,4

Из данных таблицы 3 видно, что получен ферментализат мяса мидий с высоким содержанием коротко- и среднецепочечных пептидов с молекулярной массой менее 3,5 кДа (48,4 %).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С использованием метода математического планирования эксперимента установлены рациональные параметры технологического процесса, обеспечивающие заданное молекулярно-массовое распределение пептидных фракций в составе ферментативного гидролизата: продолжительность ферментализации — 10–12 ч, концентрация ферментного препарата «Протозим» — 5–7 % от массы сухих веществ мяса

мидий и концентрация мяса мидий в смеси — 5–7% по сухому веществу. Получен ферментализат мяса мидий, на 48,4% состоящий из низкомолекулярных пептидных фракций.

ЛИТЕРАТУРА

- Арнаутов М. В. 2011. Одностадийный и двухстадийный ферментативный гидролиз мяса мидий // Материалы II научно-практической конференции молодых ученых «Современные проблемы и перспективы рыбохозяйственного комплекса». М.: Изд-во ВНИРО. С. 178–183.
- Арнаутов М. В., Абрамова Л. С., Абрамов Д. В., Сидорова Ю. С., Зорин С. Н., Мазо В. К. 2013. Отработка технологии ферментативного гидролиза мяса мидий в полупромышленных масштабах // Рыбное хозяйство. № 1. С. 112–116.
- Арнаутов М. В., Абрамова Л. С., Сидорова Ю. С., Зорин С. Н. 2012. Способы получения гидролизатов из мяса мидий и их биологическая активность // Материалы научной конференции молодых учёных, посвящённой 90-летию со дня постройки первого научно-исследовательского судна ПИНРО «Персей». С. 26–31.
- Арнаутов М. В., Сидорова Ю. С., Зорин С. Н. 2011. Получение ферментализатов мяса мидий и оценка молекулярно-массового распределения их пептидных фракций // Материалы IV научно-практической конференции «Пищевая и морская биотехнология — для здорового питания и решения медико-социальных проблем». Светлогорск. С. 8–9.
- Арнаутов М. В. 2013. Разработка технологии ферментативного гидролизата из мяса мидий, предназначенного для создания обогащенных пищевых продуктов. Автореф. дисс. ... канд. техн. наук. М.: Изд-во ВНИРО. 24 с.
- Боровиков В. П. 2003. Statistica: искусство анализа данных на компьютере. СПб: Питер. 688 с.
- Лагунов Л. Л., Рехина Н. И. 1967. Технология продуктов из беспозвоночных // М.: Пищ. пром-сть. 127 с.
- Лагунов Л. Л., Рехина Н. И., Новикова М. В., Ордуханян Н. И., Беседина Т. В., Королев А. Н., Сысоева Л. В. 1997. Пищевой продукт из мидий для лечебно-профилактических целей // Технология рыбных продуктов. М.: Изд-во ВНИРО. С. 87–92.
- Новикова М. В. 2004. Применение мидийного гидролизата в терапевтических и косметических целях // Труды ВНИРО. Т. 143. С. 134–135.

REFERENCES

- Arnautov M. V. 2011. Odnostadijnyj i dvukhstadijnyj fermentativnyj gidroliz myasa midij [The one-step

and two-step enzymatic hydrolysis of mussel meat] // Materialy II nauchno-prakticheskoj konferentsii molodyh uchenyh «Sovremennye problemy i perspektivy rybokhozyajstvennogo kompleksa». M.: Izd-vo VNIRO. S. 178–183.

- Arnautov M. V., Abramova L. S., Abramov D. V., Sidorova Yu. S., Zorin S. N., Mazo V. K. 2013. Otrabotka tekhnologii fermentativnogo gidroliza myasa midij v polupromyshlennyh masshtabah [Development of the enzymatic hydrolysis technology of mussel meat at half-industrial scale] // Rybnoe hozyajstvo. № 1. S. 112–116.
- Arnautov M. V., Abramova L. S., Sidorova Yu. S., Zorin S. N. 2012. Sposoby polucheniya gidrolizatov iz myasa midij i ih biologicheskaya aktivnost' [Methods for producing mussel meat hydrolysates and their biological activity] // Materialy nauchnoj konferentsii molodyh uchenyh, posvyashchennoj 90-letiyu so dnya postroyki pervogo nauchno-issledovatel'skogo sudna PINRO «Persey». S. 26–31.
- Arnautov M. V., Sidorova Yu. S., Zorin S. N. 2011. Poluchenie fermentolizatov myasa midij i otsenka molekulyarno-massovogo raspredeleniya ih peptidnyh fraktsij [Production of mussel meat enzymatic hydrolysates and evaluation of the molecular weight distribution of peptide fractions] // Materialy IV nauchno-prakticheskoj konferentsii «Pishchevaya i morskaya biotekhnologiya — dlya zdorovogo pitaniya i resheniya mediko-sotsial'nyh problem». Svetlogorsk. S. 8–9.
- Arnautov M. V. 2013. Razrabotka tekhnologii fermentativnogo gidrolizata iz myasa midij, prednaznachennogo dlya sozdaniya obogashchennyh pishchevyh produktov [Development of technology for the mussel meat enzymatic hydrolyzate intended for the creation of fortified foods]. Avtoref. diss. ... kand. tekhn. nauk M.: Izd-vo VNIRO. 24 s.
- Borovikov V. P. 2003. Statistica: iskusstvo analiza dannyh na komp'yutere [Statistica: the art of data analysis by the computer]. SPb: Piter. 688 s.
- Lagunov L. L., Rekhina N. I. 1967. Tekhnologiya produktov iz bespozvonochnyh [Technology of invertebrates processing]. M.: Pishchevaya promyshlennost'. 127 s.
- Lagunov L. L., Rekhina N. I., Novikova M. V., Ordukhanyan N. I., Besedina T. V., Korolev A. N., Sysoeva L. V. 1997. Pishchevoj produkt iz midij dlya lechebno-profilakticheskikh tselej [The mussels food product for therapeutic and prophylactic application] // Tekhnologiya rybnyh produktov: Sb. nauch. trudov. M.: Izd-vo VNIRO. S. 87–92.
- Novikova M. V. 2004. Primenenie midijnogo gidrolizata v terapevticheskikh i kosmeticheskikh tselyah [Application of mussel hydrolysate in therapeutic and cosmetic purposes] // Trudy VNIRO. T. 143. S. 134–135.

Поступила в редакцию 01.06.15 г.
Принята после рецензии 26.06.15 г.

Study on rational modes of enzymatic hydrolysis of mussel meat

M. V. Arnautov, L. S. Abramova, V. V. Gershunskaya

Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography (FSBSI "VNIRO", Moscow)

At present, the acid hydrolysates of mussels meat are widely used in our country in the therapeutic and preventive nutrition. However, poor organoleptic characteristics, as well as total or partial destruction of some essential amino acids (especially tryptophan) predetermined the demand for technology of mussels enzymatic hydrolysates. The analysis of scientific publications and model experiment with the commercial preparation MIGI-K LP (mussels acid hydrolysate) through the assessment of radioresistance properties of peptides with different molecular weights determined the main indicator for mussels enzymatic hydrolysates: the content of peptide fractions with a molecular weight of less than 3,6 kDa in fermentative hydrolysates should be at least 45%. The dependence of the amine nitrogen rate and the accumulation of solids in the reaction mixture on the duration of the process, the concentration of the enzyme preparation and concentration of mussels meat in the mixture was analyzed. Rational modes of enzymatic hydrolysis of mussel meat with a given molecular weight distribution of the peptide fractions have been studied with the help of the experiment mathematical planning. Rational parameters of mussel meat enzymatic hydrolysis were: the duration of 10–12 hours, the concentration of the enzyme preparation "Protozyme" of 5–7% on solids basis and mussel meat concentration of 5–7% on solids basis. The pilot-scale study of rational modes of mussel meat enzymatic hydrolysis confirmed the possibility of fermentative hydrolysates with high biological activity, containing at least 45% of low molecular weight peptide fractions.

Key words: enzymatic hydrolysis, rational modes, Protozyme, mussel meat enzymatic hydrolysate.